DIE PHYTOCHROM-CHROMOPHORE: BIOCHEMISCHE EIGENSCHAFTEN UND WECHSELWIRKUNGEN MIT DEM APOPROTEIN

Thomas Brandlmeier

1981

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41545801_0014

DISSERTATIONS - UND FOTODRUCK FRANK GmbH
8000 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2809090

DIE PHYTOCHROM-CHROMOPHORE: BIOCHEMISCHE EIGENSCHAFTEN UND WECHSELWIRKUNGEN MIT DEM APOPROTEIN

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
des
Fachbereiches Biologie
der
Ludwigs-Maximilians-Universität
München

vorgelegt
von
Thomas Brandlmeier
aus
München

1981

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

1.Berichterstatter: Prof.Dr.W.Rüdiger
2.Berichterstatter: Prof.Dr.H.Scheer
Tag der mündlichen Prüfung: 7.7.1981

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Prof. Dr.W.Rüdiger am Botanischen Institut der Universität München angefertigt.

Herrn Prof.Dr.W.Rüdiger danke ich herzlich für die Anregung zu dieser Arbeit und für seine Unterstützung bei ihrer Ausführung durch hilfreiche Ratschläge und Diskussionen.

Herrn Prof.Dr.A.Gossauer von der TU Berlin bin ich für die Bereitstellung von totalsynthetischem Phycocyanobilin-, Phycoerythrobilin- und Phytochromobilindimethylester zu Dank verpflichtet.

Herrn Dr.H.Lehner von der Universität Wien danke ich für seine Unterstützung bei der Durchführung der CD-Messungen.

Der Technikerin Frau I.Blos, dem Elektroing. G.Rauscher und dem Feinmechaniker H.Schießl danke ich für ihre wertvolle Hilfe bei vielen praktischen Problemen.

Der DFG danke ich für die gewährte finanzielle Unterstützung.

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

	Seite
I) EINLEITUNG	1
1) Phytochrom, ein Chromoproteid	1
2) Phototransformation. Wirkungsweise	1
3) Problemstellung	5
II) MATERIALIEN UND METHODEN	7
1) Geräte	7
1.1) Photometer 1.1.1) Spektralphotometer 1.1.2) CD-Photometer 1.1.2) Photometer zur automatischen Bestimmung von $\Delta(\Delta E)$	7
1.2) Belichtungseinheit zur Phototransformation von Phytochrom. Filter	7
1.3) Rotoren	8
1.4) Gefriertrocknung	9
1.5) Durchflußphotometer, Fraktionssammler und Schlauchpumpen	9
1.6) Rechner	9
1.7) UV-Reaktor	9
1.8) Massenspektroskop	9
1.9) NMR-Spektroskop	9
1.10) Voltmeter.Potentialmessungen	10
2) Isolierung, Reinigung und Molekulargewichtsbestimmung von Phytochrom	10
2.1) Einleitung. Auswahl des Pflanzenmaterials	10
2.2) Sicherheitsvorkehrungen	11
2.3) Spektralphotometrische Bestimmung der Phytochrom-Konzentration	12
2.4) Reinheitskriterien	12
2.5) Aufzucht und Ernte von Keimlingen	14
2.6) Extraktion. Herstellung eines Rohextrakts	15
2.7) Konzentrierung des Rohextrakts mit AS und anschließende Entsalzung über eine G-50 Säule	15
2.8) Brushite-Chromatographie	16

Seite

2.9) Anionenaustauscherchromatographie an DEAE-Cellulose 17
2.10) Nachreinigung 18
2.11) Kontrolle des Molekulargewichts 23
2.12) Präparation von Haferphytochrom mit MG = 240000 23
2.13) Konzentration von Phytochromlösungen 26
2.14) Zusätzliche Reinheitsprüfung durch Gel-Elektrophorese 26
3) Isolierung von C-Phycocyanin, Allophycocyanin und C-Phycoerythrin 28
4) Darstellung von DHBV, PCB, PEB, PCT und einem Methanoladdukt an PCT 28
5) Herstellung von Chromopeptiden 29
5.1) Peptide von P_r, C-Phycocyanin und C-Phycoerythrin 29
5.2) Peptide von P_{fr} 31
6) Abspaltung und Isolierung von Chromophoren 32
6.1) Phycocyanobilin aus C-Phycocyanin 32
6.2) Phycoerythrobilin aus C-Phycoerythrin 32
6.3) Phytochromobilin aus peptischem P_r-Chromopeptid 32
7) Durchführung der Denaturierung nativer Pigmente 33
8) Dünnschichtchromatographie 33
9) Durchführung kinetischer Messungen 34
9.1) pH-Wert und Lösung 34
9.2) Messung 34
9.3) Auswertung 35
9.4) Einige Meßprobleme 39
III) DIE PHYTOCHROM-CHROMOPHORE IN DER P_r- UND DER P_{fr}-FORM 40
1) Der P_r-Chromophor 40
1.1) Extinktionskoeffizient von P_r. Chromophorzahl 40
1.1.1) Stand der Forschung 40

Seite

1.1.2) Quantitative Denaturierung von C-Phycocyanin, Allophycocyanin und P_r 41

1.1.3) Quantitativer Peptidabbau von C-Phycocyanin und P_r 41

1.1.4) Diskussion 42

1.2) Chromophorabspaltung. Strukturaufklärung 45

1.2.1) Stand der Forschung 45

1.2.2) Abspaltungsreaktionen mit Modellsubstanzen 45

1.2.3) Ergebnisse mit Phytochrom 52

1.3) CD-Messungen 55

1.3.1) Stand der Forschung 55

1.3.2) CD-Messungen an P_r, denaturiertem P_r und P_r-Peptid 56

2) Der P_{fr}-Chromophor 61

2.1) Stand der Forschung 61

2.2) Herstellung und Charakterisierung eines P_{fr}-Chromopeptids 62

2.3) CD-Messungen an P_{fr} und denaturiertem P_{fr}. Umrechnung des CD-Spektrums 70

IV) CHROMOPHOR UND PROTEIN 73

1) Dunkelrelaxationen. Langlebige Intermediate 73

1.1) Stand der Forschung 73

1.1.1) Dunkelreversion. Meßprinzip 73

1.1.2) Intermediate 79

1.1.3) Fragestellung 82

1.2) Die Dunkelreversion. Ein Sonderfall 83

1.3) Dunkelrelaxationen von P_r 86

1.4) Langlebige Intermediate 89

1.5) Einfluß weiterer Parameter. Endpunkt der Dunkelrelaxation 98

1.6) Kinetisches Verhalten mit Reduktionsmitteln 101

1.7) Anmerkungen zum Mechanismus der Phototransformation 113

2) Rückwirkung auf die Spektraleigenschaften von Phytochrom. 115

	Seite
3) Diskussion. Nachträge	121
V) ZUSAMMENFASSUNG	124
VI) TABELLEN	130
1) Meßergebnisse	131
2) Faktorenanalyse	149
3) Spektraldaten	160
VII) LITERATURVERZEICHNIS	168

Abkürzungen

P : Phytochrom
P_r: rot-(660nm-) absorbierende Form von Phytochrom
P_{fr}: dunkelrot-(730nm-) absorbierende Form von Phytochrom
P_x: Phytochrom-Intermediat(e)
HR: Hellrotlicht der Wellenlänge 660nm
DR: Dunkelrotlicht der Wellenlänge 730nm
E: Extinktion
Δ E; $\Delta(\Delta$ E): s.Kapitel II, Punkt 2.3)
RE: Rohextrakt
PC: C-Phycocyanin
APC: Allophycocyanin
PE: C-Phycoerythrin
PCB: Phycocyanobilindimethylester $^{\neq}$
PEB: Phycoerythrobilindimethylester $^{\neq}$
PCT: Phytochromobilindimethylester $^{\neq}$
DHBV: A-Dihydrooctaäthylbiliverdin $^{\neq}$

$^{\neq}$ Da die Nomenklatur für Gallenfarbstoffe einerseits noch im Flusse ist und andererseits auch die IUPAC (1979) die Notwendigkeit von Trivialnamen für den praktischen Gebrauch anerkennt, werden hier der besseren Lesbarkeit wegen gebräuchliche Trivialnamen verwendet.

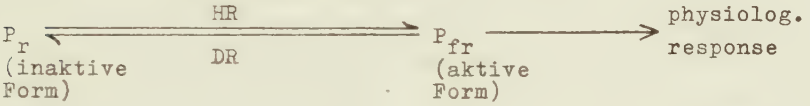
Abkürzungen(Forts.)

DC: Dünnschichtchromatographie
CD: Cirkulardichroismus
Vis: Sichtbarer Spektralbereich
UV: Ultravioletter Spektralbereich
MG: Molekulargewicht
MS: Massenspektrum
NMR: Kernmagnetische Resonanz
ME: Mercaptoäthanol
SDS: Natriumdodecylsulfat
AS: Ammonsulfat
ASF: Ammonsulfatfällung
CM: Carboximethyl-
DEAE: Diäthylaminoäthyl-
NaPP: Natriumphosphatpuffer
KPP: Kaliumphoshatpuffer
Tris-Cl: Tris(hydroximethyl)aminomethan mit HCl auf einen bestimmten pH-Wert eingestellt
EDTA: Äthylendiamintetraessigsäure, Na_4-Salz
TFA: Trifluoressigsäure
NADH: NADH + $H^{\oplus}$ = Nicotinamidadenindinucleotid, red.Form
FAD: Flavinadenindinucleotid, reduzierte Form
FMN: Flavinmononucleotid, reduzierte Form
Puffer(lsg.): Phytochrom in 10mM Tris-Cl-Puffer mit Ausgangs-pH-Wert 7,4, 10mM KCl, 1mM NaN_3, 1mM EDTA
glycerinhaltige Lösung: Puffer + Glycerin (1:1/v:v)
k_l: Geschwindigkeitskonstante der langsamen Komponente
k_s: Geschwindigkeitskonstante der schnellen Komponente
t/2: Halbwertszeit

I) EINLEITUNG

1) Phytochrom, ein Chromoproteid

Bei höheren Pflanzen und einigen Algen sind eine Vielzahl von Lichteffekten, vorallem Photomorphosen, bekannt, welche durch HR-Licht (λ_{max} ca. 660 nm) induziert und (in vielen Fällen) durch DR-Licht (λ_{max} ca. 730 nm) revertiert werden (Furuya/1968, Smith/1975). Klassisches Beispiel ist die Induktion der Samenkeimung bei Lactuca (Borthwick et al./1952a). Aufgrund dieser Befunde postulierten Borthwick et al./1952b einen HR/DR-reversiblen Photorezeptor, der diese Prozesse steuert: Phytochrom.



Seit der ersten Isolierung von Phytochrom durch Butler et al./1959 ist Phytochrom in einer Vielzahl von Pflanzen nachgewiesen worden (z.B.: Lane et al./1963. Taylor und Bonner/1966). Phytochrom konnte als ein Biliprotein identifiziert werden (Siegelman und Butler/1965), das aus einem Gallenfarbstoff-Chromophor und einem kovalent gebunden Apoprotein besteht (Siegelman et al./1966, Rüdiger/1969).

2) Phototransformation. Wirkungsweise

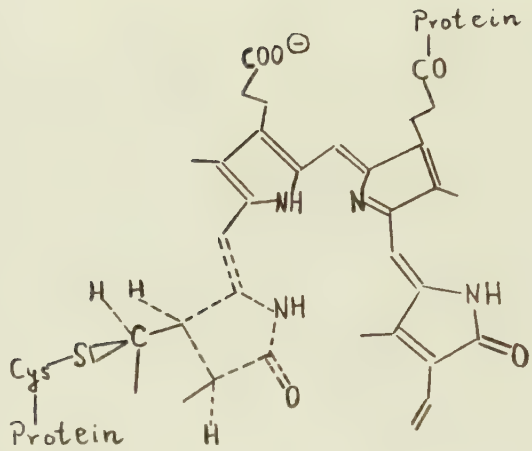
Um physiologisch wirksam zu werden, muß Phytochrom offenbar von der P_r-Form in die P_{fr}-Form transformiert werden. Der primäre Impuls ist ein Quant Licht, das vom P_r-Chromophor absorbiert wird. Über alles, was danach geschieht, gibt es bislang nur sehr lückenhafte Information. Aus Tieftemperatur- und Blitzlichtphotolyse-Experimenten ergibt sich, daß nach einer Reihe chemischer Veränderungen, die den Chromophor und seine nächste Umgebung betreffen, Veränderungen in der Konformation des Proteins erfolgen (zusammengefaßt von Kendrick und Spruit/1977). Abgeschlossen wird die Phototransformation durch die Ausbildung von P_{fr}. Durch chemische Modifizierung von Aminosäuren konnten neuerdings Hunt und Pratt (in press) zeigen, daß Histidin, Cystein und Tyrosin in P_r und P_{fr} unterschiedlich exponiert sind, was nicht ohne eine Konformationsänderung von Chromophor und/oder Protein möglich ist. Die phy-

siologische Wirkung des P_{fr} wäre jedenfalls dem veränderten Protein zuzuschreiben. Als primäre schnelle Reaktion des P_{fr} (ca. 30" bei 25°C) gilt eine membrannahe Kopplung mit einem bislang unbekannten Rezeptor (oder Rezeptoren); Zusammenfassungen: Mohr/1974, Schäfer/1976, Marmé/1977, Pratt/1978, Marmé 1979. Die ersten Befunde dieser Art führten zu der bereits von Hendricks und Borthwick/1967 geäußerten Hypothese, daß Phytochrom die Konformation spezifischer Membranen und ihre Permeabilität steuert. Eine solche schnelle Reaktion könnte schnelle Phytochrom-gesteuerte physiologische Effekte erklären. Viele Phytochrom-Effekte treten aber erst nach Stunden in Erscheinung. Für sie bietet sich ein Modell von Mohr/1966 an, das die Phytochromwirkung auf eine"differentielle Genaktivierung" bzw. in den letzten Jahren modifiziert auf die "Genexpression" bezieht. Verschiedene neuere Untersuchungen an m-RNA liefern dafür auch experimentelle Anhaltspunkte (Tobin/1978, Schröder et al./1979, Apel 1980). Für die photochemische Rückreaktion von P_{fr} nach P_r ergibt sich aus Tieftemperatur- und Blitzlichtphotolyse-Experimenten, daß die Rückreaktion auf getrenntem Weg gegenüber der Hinreaktion erfolgt, wenngleich der Gesamtablauf ähnlich ist (zusammengefaßt von Kendrick und Spruit/1977).

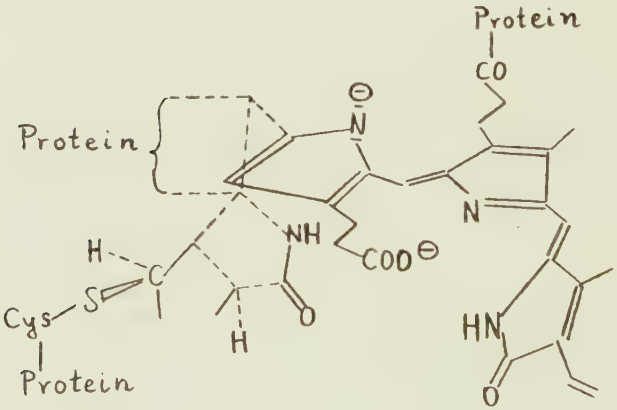
Neben der photochemischen Transformation von P_{fr} nach P_r gibt es eine langsame nichtphotochemische Umwandlung von P_{fr} in P_r im Dunkeln, die bei Dikotyledonen in vivo und in vitro (Butler und Lane/1965, Manabe und Furuya/1971) und bei Phytochrom aus Monokotyledonen in vitro (Correll et al./1968b) gefunden wurde. Über die Natur dieses Phänomens ist wenig bekannt. Die verschiedenen Autoren sind sich aber über eine Abfolge von mindestens zwei Kinetiken dieses Prozesses einig; ob die verschiedenen Spezies, die dabei auftreten, chemisch oder biochemisch verschieden sind, ist völlig offen. Dies umso mehr, da auch die Frage der Chromophorzahl offen ist (Correll et al./1968b, Pratt/1975a, Spruit und Kendrick/1977) und evt. eine Interaktion von Chromophoren, wie sie von mehreren Biliproteinen bekannt ist (z.B.: Teale und Dale/1970, Vernotte/1971) vorliegen könnte. Wie Mumford und Jenner/1971 fanden, wird die nichtphotochemische Transformation von P_{fr} nach P_r durch Reduktionsmittel katalysiert. Weiterhin konnten Grombein

et al./1975 an denaturiertem P_r (Maximum 680nm) mit Kaliumhexacyanoferrat-III eine Umwandlung in denaturiertes P_{fr} (Maximum 620nm) simulieren (vermutlich durch Oxidation der Methinbrücke zwischen Ring A und B des Chromophors). Eine Untersuchung von Krauss/1980 zeigte, daß sich diese oxidative Umwandlung von den.P_r in den.P_{fr} auch mit Modellchromophoren durchführen läßt; ob die so erhaltenen Violine tatsächlich dem P_{fr}-Chromophor entsprechen, bedarf detaillierterer Kenntnis des P_{fr}-Chromophors. Jedenfalls sprechen alle diese Befunde für die Beteiligung einer Redoxreaktion an der Transformation von Phytochrom. Andere Untersuchungen an Modellen fanden für einen P_{fr}-Chromophor-Typ einen anionischen, für einen P_r-Chromophor-Typ einen neutralen oder kationischen Zustand im physiologischen Milieu als wahrscheinlich (Crespi et al./1967, Fuhrhop et al./1975, Köst et al./1975, Pasternak und Wagnière/1979, Rüdiger 1972b, Rüdiger und Corell/1969). Spektralmessungen an denaturiertem Phytochrom, in dem der Einfluß des Proteins ausgeschaltet ist, ergaben, daß das P_{fr}-Kation mit einem Maximum bei 620nm gegenüber dem P_r-Kation (Maximum 680nm) hypsochrom verschoben ist, bzw. ein verkürztes konjugiertes System hat. Da weiterhin natives P_{fr} ein Maximum bei 725nm hat, darf man annehmen, daß die Absorption des nativen P_{fr} durch den Einfluß des Proteins drastisch verlängert ist. Auf Belichtung bei 620nm wandelt sich das P_{fr}-Kation irreversibel in das P_r-Kation um; diese Umwandlung erfolgt - in einer gewissen Analogie zur Umwandlung von P_{fr} in P_r - auch langsam im Dunkeln. Für die Struktur des P_r-Chromophors ergeben sich im Abbau mit Chromsäure und bei der Denaturierung übereinstimmende Ergebnisse (Klein et al./1977). Im Vergleich mit Modellen konnte die relative Konfiguration des P_r-Chromophors an C-2, C-3 und C-3^1 aufgeklärt werden (Klein und Rüdiger/1978). In Zusammenfassung der wichtigsten Modelle (Grombein et al./1975, Scheer/1976, Klein et al./1977, Klein und Rüdiger/1978, Pasternak und Wagnière/1979, Krauss/1980) lassen sich für den P_r- und P_{fr}-Chromophor im nativen Milieu folgende Vorschläge formulieren (Abb.1).

A)



B)



C)

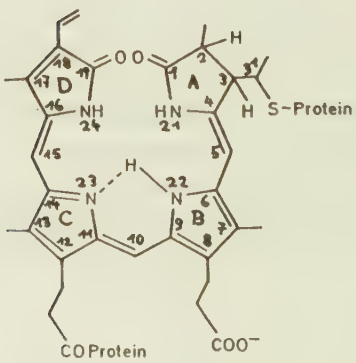


Abb.1) Strukturvorschläge für
A) den P_r-Chromophor,
B) den P_{fr}-Chromophor;
C) schematische Darstellung des P_r-Chromophors zur Erläuterung der Nomenklatur.

3) Problemstellung

Zum Verständnis der Wirkungsweise von Phytochrom ist es von elementarer Notwendigkeit die Struktur des Chromophors in seinen beiden Formen aufzuklären und die Reaktionsmechanismen der Phototransformation von P_r nach P_{fr} und umgekehrt zu entschlüsseln. Weiterhin ist es nötig die Veränderungen am Protein zu verstehen, die die physiologische Wirksamkeit erst ermöglichen. Diese Arbeit sollte dazu einen Beitrag liefern. Zu diesem Zweck wurde Phytochrom in seinen beiden Formen mit biochemischen (Herstellung und Charakterisierung von Peptiden), physikalisch-chemischen (CD-Messungen) und chemischen (Chromophorabspaltung, Denaturierung, Modellsubstanzen) Methoden untersucht, die Dunkelrelaxation von Phytochrom unter verschiedenen chemischen Bedingungen kinetisch verfolgt, sowie Untersuchungen zum thermodynamischen und photochemischen Gleichgewicht von Phytochrom angestellt.
Für diese Untersuchungen war sowohl die Isolierung von nahezu reinem Phytochrom wie auch die Isolierung von großen Mengen an Phytochrom notwendig. Als Pflanzenmaterial wurde Hafer (Avena sativa) wegen seines vergleichsweise hohen Phytochromgehalts (Siegelman und Firer/1964) ausgewählt. Hafer neigt dazu aus dem dimeren Phytochrom (MG = 240000 mit zwei Untereinheiten à 120000) niedermolekulares monomeres Phytochrom (MG = 60000) zu bilden (Rice et al./1973). Da sich diese Arbeit mit dem Chromophor und seiner nächsten Umgebung befaßt, konnte dies für die routinemäßige Aufarbeitung vernachlässigt werden, die in Tab.1) zusammengefaßt ist. Soweit es in Einzelfällen notwendig erschien, wurde auch hochmolekulares Hafer-Phytochrom angereichert. In beiden Fällen wurde das von Rice et al./1973 beschriebene Verfahren modifiziert, da es sich nicht vollständig reproduzieren ließ (vgl. auch verschiedene kritische Anmerkungen: Briggs et al./1972, Briggs und Rice/1972, Rüdiger/1972a), wobei auch eine säulenchromatographische Präparation von hochmolekularem Hafer-Phytochrom beschrieben ist (vgl. Kapitel II, Punkt 2). Die reinsten Fraktionen, die mit dem hier verwendeten Verfahren erhalten wurden, haben einen Reinheitsindex von 1 bis 2; reines Phytochrom hat nach Rice et al./1973 einen Reinheitsindex um 1 (zur Definition des Reinheitsindex s. Kapitel II, Punkt 2.4).

Tab.1) Anreicherungsschema für die Reinigung von Haferphytochrom (MG = 60000)
(Standardwerte aus über 100 Einzelpräparationen)

Schritt	Vol. (ml)	Δ(Δ E)	Phytochrom-einheiten	Ausbeute bezogen auf RE (%)	Ausbeute bezogen auf letzte Stufe (%)	Protein (mg/ml)	spezifische Aktivität	Anreicherung bezogen auf RE	Anreicherung bezogen auf letzte St.	Reinheitsindex
RE aus 3 kg Keiml.	3800	0,018	68,4	100	100	7,5	0,002	1	1	1210
G-50 (incl. 33% ASF)	490	0,083	40,7	59,5	59,5	13,5	0,006	3	3	472
Brushite	330	0,089	29,4	43,0	72,2	1,3	0,074	37	12,3	38
DE-52	380	0,062	23,6	34,5	80,3	0,47	0,132	66	1,8	10,3
DEAE-Sepharose	90	0,188	16,9	24,7	71,6	0,89	0,211	105,5	1,6	6,2
CM-Sephadex	110	0,079	8,7	12,7	51,5	0,18	0,438	221,5	2,1	2,8
G-200	140	0,048	6,7	9,8	77,0	0,09	0,533	266,5	1,2	2,1
DEAE-Sephacel	8	0,492	3,9	5,7	58,2	0,62	0,794	397	1,5	1,45

II) MATERIALIEN UND METHODEN

1) Geräte

1.1) Photometer

1.1.1) Spektralphotometer

UV-Vis-Spektren wurden mit dem 2-Strahl-Spektralphotometer DMR 22 mit Doppelmonochromator (Fa.Zeiss, Oberkochen) und dem 2-Strahl-Spektralphotometer Perkin Elmer 320 mit Baseline-Rechner registriert. Der Küvettenraum des DMR 22 ist mit einer Heizung bzw. Kühlung und einer Druckluftspülung ausgestattet.

1.1.2) CD-Photometer

Die CD-Spektren wurden mit dem Gerät Dichrographe Mark III (von Jobin-Yvon, France) bei 4°C in zylindrischen Quarzküvetten registriert (Spalt 10 Å, Geschwindigkeit 0,1nm/sec für denaturierte Chromophore und 1nm/sec für native Pigmente). Die Durchführung der Messungen besorgte freundlicherweise Dr.H.Lehner von der Universität Wien.

1.1.3) Photometer zur automatischen Bestimmung von $\Delta(\Delta E)$

Zur Bestimmung des Phytochromgehalts von Lösungen ($\Delta(\Delta E)$) wurde ein speziell für diesen Zweck angefertigtes Einstrahlmeßgerät verwendet, das alternierend den Meßstrahl über ein HR- und ein DR-Filter leitet und die jeweiligen Signaldifferenzen über einen log-Wandler verarbeitet. Über einen Programmer wird die Phototransformation der Probe nach jedem Meßzyklus mit HR- und DR-Licht gesteuert. Die so erhaltenen Signaldifferenzen zwischen den Zyklen entsprechen direkt dem Phytochromgehalt der Lösung ($\Delta(\Delta E)$). Eine detaillierte Beschreibung des Geräts findet sich bei Guthoff/1978. Die mechanischen Teile hat Herr H.Schießl angefertigt, die Elektronik Herr G.Rauscher.

1.2) Belichtungseinheit zur Phototransformation von Phytochrom. Filter

Die Phototransformation von Phytochrom wurde mit Hilfe einer Belichtungseinrichtung durchgeführt, die es erlaubt die Küvetten direkt im Spektralphotometer senkrecht von oben zu bestrahlen. Es wurden Interferenzfilter nahe am Maximum von P_r (660,3 nm, Halbwertsbreite = 12,8nm, max.Transmission = 78%) und P_{fr} (728,3nm, Halbwertsbreite = 14nm, max.Transmission = 75%) ge-

wählt, die eine rasche und weitgehend vollständige Umwandlung ermöglichen (Hersteller: Fa.Searom, France). Lichtquelle ist eine 12V-Lampe, deren Wärmestrahlung mit einem Schutzfilter stark reduziert wird. Ein Netzgerät sorgt für konstante Spannung und Steuerung der Belichtungszeiten. Gemessen im Bereich des Meßstrahls des Photometers ergibt sich für das HR-Filter eine Intensität von 64 (W/m^2), für das DR-Filter von 31 (W/m^2). Die Zeiten für eine sättigende Belichtung unter diesen Bedingungen sind in Tab.2) zusammengefaßt.

Tab.2)

$\Delta(\Delta E)$	660 nm	730 nm
<0,1	30 sec	1 min
>0,1	1 min	3 min
>0,5	2 min	7 min

Für Belichtungsversuche im Dunkelroten, die auch noch die letzten Reste eines Hellrot-Anteils vermeiden, wurden Cut-Off Filter jenseits 730nm (RG 780 und RG 830, Fa.Schott, Mainz) bzw. ein Interferenzfilter von Schott bei 764nm (Halbwertsbreite = 11nm, max.Transmission = 46%) verwendet. Zur Herabsetzung der Intensität auf 10% wurde ein Neutralglas verwendet (NG 4, Schott). Zur Eliminierung von Wärmestrahlung wurde ein Cut-Off Filter verwendet (RG 9, Schott). Für Belichtung im blauen Spektralbereich wurde ein Filter bei 436nm (ca.30 W/m^2) verwendet, im orangen Spektralbereich ein Filter bei 578nm (ca.80 W/m^2).

1.3) Rotoren

Natives Pigment wurde nur in der Kühlzentrifuge G 50 K (Fa.WKF, Brandau) abzentrifugiert. Dabei wurden die Rotoren stets mit maximaler Geschwindigkeit gefahren, wobei sich für den Rotor 6 x 1000ml 14000g ergeben, für 6 x 500ml 18000g, für 6 x 250ml 42000g, für 6 x 100ml 42000g und für 8 x 38ml 40000g.

1.4) Gefriertrocknung

Zur Gefriertrocknung von Peptiden wurde eine Anlage vom Modell L 03 (WKF, Brandau) verwendet.

1.5) Durchflußphotometer, Fraktionssammler und Schlauchpumpen

Die Transmission von Säuleneluaten wurde bei 280nm mit Durchflußphotometern Uvicord II der Fa.LKB (Schweden) gemessen und mit Schreibern Typ WPS 1 der Fa.Colora (Lorch) registriert. Eluate wurden mit Fraktionssammlern Typ Mini Escargot der Fa. Gilson gesammelt. Die Schlauchpumpen waren von der Fa.Gilson, Typ Minipuls 2, und der Fa.Heidolph Elektro KG, Typ RZG 1.

1.6) Rechner

Die rechnerische Analyse von UV-Vis-Spektren (2.Ableitung, Normierung, Subtraktion etc.) wurde mit einem programmierbaren Rechner der Fa.Bryans Southern, USA, Modell BS 8110, durchgeführt, der über einen externen Anschluß direkt mit dem Spektralphotometer DMR 22 gekoppelt werden kann. Die rechnerische Auswertung kinetischer Messungen wurde mit einem programmierbaren Rechner der Fa.Texas Instruments, USA, Modell TI 59, durchgeführt.

1.7) UV-Reaktor

Photochemische Isomerisierungen an Tetrapyrrolverbindungen durch Bestrahlung im nahen UV-Bereich wurden in einem Photoreaktor Typ Rayonet der Fa.Southern New England Ultraviolet Company durchgeführt.

1.8) Massenspektroskop

Massenspektroskopische Untersuchungen zur Analyse von Modellverbindungen wurden mit dem Gerät JMS D 100 der Fa.Jeol, Japan, durchgeführt (75ev, Quellentemp. 250°C, Probentemp. 110°C). Die Ausführung der Analysen übernahm freundlicherweise Frau I.Blos.

1.9) NMR-Spektroskop

^{1}H-NMR-Spektren von Modellverbindungen wurden mit dem Gerät XL-100 (Varian) bei 270MHz angefertigt; die Ausführung besorgte freundlicherweise Dr.R.Zeisberg von der TU Berlin.

1.10) Voltmeter. Potentialmessungen

Potentialmessungen an Phytochrom wurden mit einem kombinierten pH- und Voltmeter PHM 64 der Fa.Radiometer Kopenhagen durchgeführt. Dabei wurde Phytochrom in einer Argon-Zelle mit Thermostat gemessen, die sowohl belichtet werden konnte, wie auch mit einem Photometer (Aminco DW-2 UV-Vis Spektralphotometer) vermessen werden konnte. Bei der technischen Durchführung der Arbeiten half freundlicherweise Herr R.Mannhart vom Genetischen Institut/Universität München.

2) Isolierung, Reinigung und Molekulargewichtsbestimmung von Phytochrom

2.1) Einleitung. Auswahl des Pflanzenmaterials

In der Literatur sind verschiedene Verfahren zur Reinigung von Phytochrom beschrieben (u.a.: Butler et al./ 1959, Miller et al./1965, Siegelman und Firer/1964, Mumford und Jenner/1966, Correll et al./1968a, Kroes et al./1969, Kroes/1970, Roux et al./1975). Die wichtigsten Arbeiten sind die von Rice et al./ 1973, die erstmals reines Phytochrom mit klassischen chromatographischen Methoden (Calciumphosphat-, DEAE-Cellulose- und CM-Sephadex-Ionenaustauscherchromatographie herstellten und die Arbeit von Hunt und Pratt/1979, die reines Phytochrom nach Brushitechromatographie mit Immunaffinitätschromatographie herstellten.
Hier ist eine Variante des Verfahrens von Rice et al./1973 beschrieben, da sich dieses Verfahren nicht vollständig reproduzieren ließ. Insbesondere die Brushitechromatographie wurde stark variiert; Briggs und Rice/1972 räumen in einem Review-Artikel ein:"That brushite shows variable behaviour even in the same laboratory is exemplified by our own work."
Phytochrom wird aus etiolierten Pflanzen extrahiert, da a) der Phytochromgehalt grüner Pflanzen wesentlich geringer ist (nach Lane et al./1963 kleiner als 5%) und b) das in grünen Pflanzen in großen Mengen vorhandene Chlorophyll die Reinigung und spektralphotometrische Bestimmung von Phytochrom stört (Absorption von Rotlicht!).
Als Pflanzenmaterial dient Hafer (Avena sativa) wegen seines vergleichsweise hohen Phytochromgehalts (Siegelman und Firer/

1964). Hafer neigt allerdings dazu aus dem dimeren Phytochrom (MG = 240000 mit zwei Untereinheiten à 120000) niedermolekulares monomeres Phytochrom (MG = 60000) zu bilden (Rice et al./1973). Da sich diese Arbeit mit dem Chromophor und seiner nächsten Umgebung befaßt, konnte dies für die routinemäßige Aufarbeitung vernachlässigt werden. In Anschluß an die Darlegung der routinemäßigen Präparation wird die Herstellung von hochmolekularem Hafer-Phytochrom beschrieben.

2.2) Sicherheitsvorkehrungen

Zum Schutz des lichtempfindlichen Pigments ist grünes Sicherheitslicht notwendig (Butler et al./1964, Mumford/1966). Die von Leuchtstoffröhren (Philips TL 40 W/17) emittierte Strahlung wird dazu durch eine dreiteilige Plexiglaskombination in der Anordnung grün-orange-grün (Fa.Röhm und Haas GmbH Darmstadt, Nr.478 orange, Nr.701 grün) gefiltert. Die Präparation und Aufbewahrung von Phytochrom geschieht bei ca. $4^{o}C$. Zur längeren Aufbewahrung werden Keimlinge und Lösungen bei $-20^{o}C$ eingefroren (der unvermeidliche Phytochromverlust durch Frieren/Tauen beträgt bis zu 10%). Da Phytochrom nur zwischen pH 6 und 8 stabil ist (Kroes/1969), ist darauf zu achten, daß dieser pH-Bereich eingehalten wird. Ein besonderes Problem stellt offenbar ein spezifisches proteolytisches System für Phytochrom dar (u.a.: Pike und Briggs/1972, Briggs und Rice/1972, Rice et al./1973); im Unterschied zu anderen Autoren (Gardner et al./1971, Rice et al./1973) ist es hier nicht gelungen mit Phenylmethansulfonylfluorid als Proteasenhemmstoff wesentlich bessere Ergebnisse zu erzielen. Eine Konzentration von 2mM Na_2SO_3 erwies sich hingegen als wirksamer Schutz von Phytochromlösungen gegen Oxidation wie auch teilweise gegen Proteasen (Grombein/1976, Guthoff/1978); soweit nicht anders angegeben ist Na_2SO_3 bei der Präparation allen Lösungen in dieser Konzentration zugesetzt. Na_2SO_3 wird aus einer 1M Stammlösung, die mit HCl auf pH 7,0 eingestellt ist, zugegeben; die Stammlösung wird alle 6 Wochen neu angesetzt. Denaturierende Agentien (z.B.: organische Lösungsmittel, Schwermetalle) werden ferngehalten und es ist zu vermeiden, daß Denaturierung durch Schäumen der Lösung eintritt. Phytochrom ist darüber hinaus sehr empfindlich gegen hohe Ionenkonzentrationen (ab ca. 500mM), aber auch gegen Mangel an Ionen (z.B.Dialyse gegen dest.Wasser).

2.3) Spektralphotometrische Bestimmung der Phytochrom-Konzentration

Die Eigenschaft des Phytochroms in zwei photoreversiblen Formen vorzukommen, ist Grundlage der spektralphotometrischen Bestimmung des Phytochromgehalts (Butler et al./1959, Butler et al. 1963). Die Bestimmung der Phytochrom-Konzentration erfolgt durch Messung der Extinktionsdifferenz $\Delta E = E_{660} - E_{730}$ jeweils nach Belichtung der Meßlösung mit Rot (660 nm) - bzw. Dunkelrot (730 nm) - Licht. Die Differenz der so erhaltenen Werte ergibt als Maß für die Phytochrom-Konzentration den Wert $\Delta(\Delta E)$. Alle Messungen werden in 1cm-Küvetten durchgeführt. Es gelten folgende Beziehungen (vgl. Abb.2):

Phytochrom-Konzentration = $\Delta(\Delta E) = \Delta E_{730} - \Delta E_{660}$;

$\Delta E_{730} = (E_{660} - E_{730})$ nach Dunkelrot (730 nm) - Belichtung;

$\Delta E_{660} = (E_{660} - E_{730})$ nach Hellrot (660 nm) - Belichtung;

Die Gesamtmenge an Phytochrom in einer Lösung erhält man durch Multiplikation der Phytochrom-Konzentration $\Delta(\Delta E)$ mit dem Volumen der Lösung. Der so erhaltene Wert gibt die Anzahl von "Phytochrom-Einheiten" in der Lösung an:

Phytochrom- Einheiten = $\Delta(\Delta E)$ x Vol.(ml).

2.4) Reinheitskriterien

Zur Bestimmung des Proteingehalts von Lösungen wurden für konzentrierte Lösungen (1 - 10 mg/ml) die Biuretprobe nach Roswell/ 1962 und für dünne Lösungen (0,1 - 1 mg/ml) ein Trübungstest mit Trichloressigsäure verwendet: 1ml der proteinhaltigen Probe wird in eine Küvette (1x1x4,5 cm) gegeben, 1,5ml 10%ige Trichloressigsäure werden zugegeben und gut umgeschüttelt. Exakt 30" nach Zugabe der Trichloressigsäure wird im Spektralphotometer bei 500nm die Trübung, hervorgerufen durch ausgefälltes Protein, gegen den Nullwert (1ml Wasser + 1,5ml 10%ige Trichloressigsäure) gemessen. Eine Eichkurve läßt sich mit Rinderserumalbumin (10mg/ 10ml Wasser) im Bereich von 0,1 - 1,0mg Protein aufstellen. Bezieht man die Konzentration an Phytochrom in $\Delta(\Delta E)$ auf die Proteinkonzentration in mg/ml in einem Extrakt, so erhält man als Maß für die Reinheit einer Phytochromlösung die spezifische Aktivität, die im Verlauf einer Reinigung zunimmt:

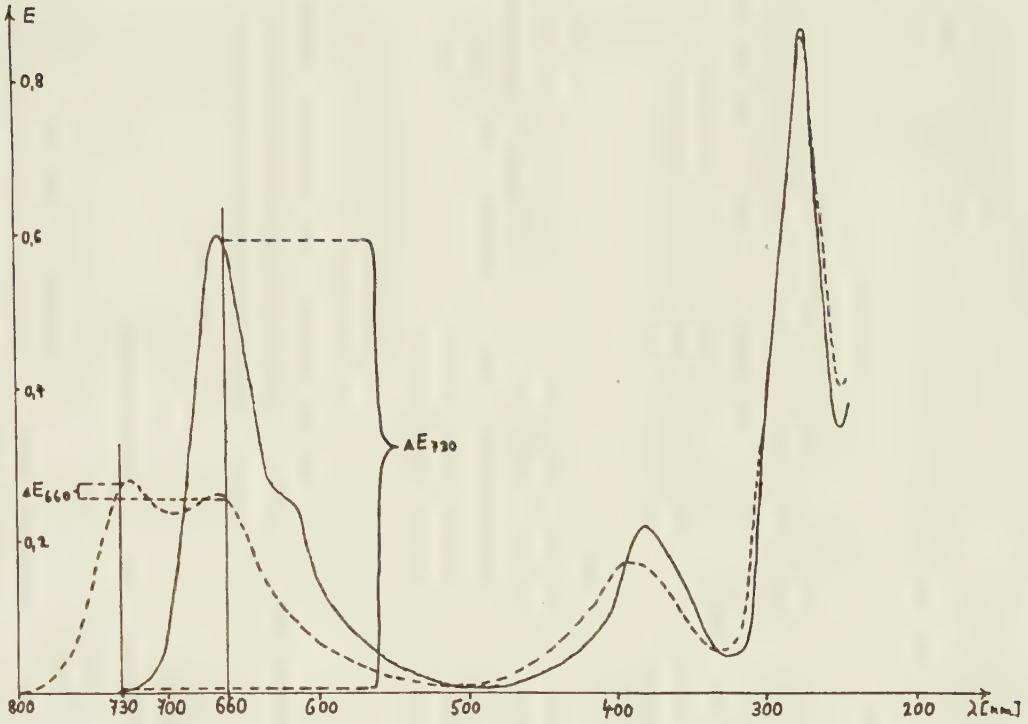


Abb.2) Absorptionsspektrum von Phytochrom (MG = 60000) in der P_r- und P_{fr}-Form mit den zur $\Delta(\Delta E)$-Bestimmung notwendigen Größen.

$$\text{Spezifische Aktivität} = \frac{\Delta(\Delta E)}{\text{Proteingehalt (mg/ml)}}$$

Ein anderes Maß für die Reinheit ist der Reinheitsindex; er ist besonders für angereicherte Proben geeignet. Er berechnet sich für Proben in der P_r-Form nach Rice et al./1973:

$$\text{Reinheitsindex} = E_{280} : E_{665}$$

In Lösungen mit geringer Reinheit erhält man auf diese Weise aber falsche Werte, da E_{665} durch Fremdsubstanzen und Trübung sehr hoch ist, ohne daß dies auf Absorption von Phytochrom beruht. Hier hilft die Tatsache, daß in reinen P_r-Lösungen E_{665} nahezu gleich $\Delta(\Delta E)$ ist. Somit kann der Reinheitsindex auch auf unreine Proben angewandt werden:

$$\text{Reinheitsindex} \approx E_{280} : \Delta(\Delta E)$$

Im Verlauf der Reinigung wird dieser Wert kleiner. In reinem Phytochrom liegt er bei 1 (0,8 für niedermolekulares Phytochrom aus Hafer und 1,3 für hochmolekulares Phytochrom aus Roggen nach Rice et al./1973).
Die Anreicherung wird definiert nach:

$$\text{Anreicherung} = \frac{\text{spez.Aktivität nach Reinigungsschritt}}{\text{spez.Aktivität vor Reinigungsschritt}}$$

Zusätzliche Information über die Reinheit des Produkts liefern Disk-Gelelektrophorese und SDS-Gelelektrophorese; zur Kontrolle des Molekulargewichts dienen SDS-Gelelektrophorese und Sephadex G-200 Chromatographie. Diese Punkte sind weiter hinten extra ausgeführt.

2.5) Aufzucht und Ernte von Keimlingen

2,8l Vermiculith (Körnung Nr.4) werden in Plastikwannen (60 x 50 cm) ausgebreitet und mit 2l Leitungswasser von ca. 40°C getränkt. 300g Saathafer (Avena sativa, Sorten: Parcival, Husar oder Leanda, ungebeizt)werden gleichmäßig darauf ausgesät, mit einer Lochplatte (Durchmesser der Löcher 3mm) abgedeckt und in einem Brutschrank (11701, Fa.Hofmann, Nellingen/F.) bei 27 - 28°C und maximaler Luftfeuchtigkeit im Dunkeln zum Keimen gebracht. Nach ca.3,5 Tagen ist ein Optimum der spez. Aktivität und der Phytochrom-Einheiten pro Platte erreicht (vgl.

nächster Punkt); die Keimlinge werden dann unter grünem Sicherheitslicht mit Hilfe einer Spachtel über der Lochplatte abgeschnitten. Die so erhaltenen Keimlinge (ca. 100g pro Platte) sind 1,5 bis 2,5cm lang. Können die Keimlinge nicht sofort aufgearbeitet werden, werden sie bei -20°C tiefgefroren aufbewahrt.

2.6) Extraktion. Herstellung eines Rohextrakts

3kg Haferkeimlinge werden mit 1800ml Wasser, 200ml 0,5M Tris-Cl/pH 8,5 und 60ml 1M Na_2SO_3 in einem 4l-Mixer (in zwei Portionen) bei ca. 10°C homogenisiert und in einem Leinensack mit einer 10l-Weinpresse ausgepreßt. Das Filtrat (ca.4l) wird mit 7g AS und 0,33ml einer 3M $CaCl_2$-Lsg. je 100ml unter Rühren versetzt und 20min. bei 14000g abzentrifugiert. $CaCl_2$ wird zur Ausfällung von Pektinat zugesetzt, die zugesetzte AS-Menge liegt an der Untergrenze der Fällbarkeit von Phytochrom; es treten dabei Phytochromverluste von 5 - 10% auf. Die extrahierbaren Mengen an Phytochrom unterliegen sehr großen Schwankungen, bedingt durch die Qualität des Hafers. Im Mittel erhält man aber bei den gewählten Bedingungen der Anzucht und Extraktion mit 23 Phytochrom-Einheiten pro Kilo Keimlinge und einer spez. Aktivität von $2,4 \times 10^{-3}$ $\Delta(\Delta E)$ pro Protein (mg/ml) Werte, die über allen vergleichbaren Literaturwerten liegen.

2.7) Konzentrierung des Rohextrakts mit AS und anschließende Entsalzung über eine Sephadex G-50 Säule

Vor der weiteren Aufreinigung sollte der Rohextrakt noch 30min. bei hoher g-Zahl (ca. 40000) abzentrifugiert werden, da sonst erfahrungsgemäß die Brushite-Chromatographie (s.nächster Punkt) problematisch werden kann; Ca-Ionen, die die Brushite-Chromatographie ebenfalls stören können, müssen mit EDTA entfernt werden. Dies wird mit einer 33%igen ASF kombiniert, die den Rohextrakt auf ein handliches Volumen bringt; anschließend wird über eine Sephadex G-50 Säule entsalzt. Der Reinigungseffekt der beiden Schritte ist bescheiden angesichts größerer Phytochromverluste.

Man gibt langsam und unter Rühren zu dem RE 13g AS je 100ml Filtrat, so daß eine Endkonzentration von 33% AS entsteht,rührt

1omin. und zentrifugiert dann 20min. bei 14000g ab. Der Niederschlag wird in ca. 150ml Puffer (10mM Tris-Cl/pH 7,4, 10mM KCl, 1mM EDTA, 1mM NaN_3) resuspendiert und 30min. bei 43000g abzentrifugiert. Der zweite Niederschlag wird nochmals mit ca. 50ml des obigen Puffers aufgeschlämmt und 30min. bei 43000g abzentrifugiert. Die vereinigten Überstände (ca. 400ml) werden zum Entsalzen über eine Sephadex G-50 Säule (ø 10cm, 50cm lang) gegeben, die mit dem Resuspendierungspuffer äquilibriert ist. Im Ausschlußpeak der Säule (ca. 500ml) ist das entsalzte Phytochrom. Diese Lösung wird für die anschließende Brushite-Chromatographie auf pH 7,0 eingestellt (mit 2n HCl) und nötigenfalls mit bidest. Wasser auf eine Leitfähigkeit < 4mS eingestellt.

2.8) Brushite-Chromatographie

Der wichtigste, weil bei weitem effektivste Schritt jeder Phytochrom-Präparation ist die Brushite-Chromatographie. Brushite ist ein $CaHPO_4$-Gel von besonders großer, für Chromatographie geeigneter Korngröße. Man muß das Gel selbst herstellen; im Handel erhältliche Verbindungen sind ungeeignet.
Man legt in einem 40l-Gefäß 2l 1M $CaCl_2$ (Merck 2381, reinst) vor und gibt unter vorsichtigem Rühren mit Rührmotor (kein Magnetrührer, der die Kristallite zermahlt!) bei Raumtemperatur von mind. 20°C 10l 1M $CaCl_2$ und 10l 1M K_2HPO_4 (Merck 5101, reinst) tropfenweise (je ca. 4ml/min.) zu. Danach läßt man das Gel 10 Tage ohne weiteres Rühren bei Raumtemperatur von mind. 20°C in der Mutterlauge stehen. Dann gießt man die Mutterlauge ab und wäscht mit Wasser neutral (ca.5 x 5l). Das Gel wird mit Wasser auf 12l aufgefüllt und bei 4°C aufbewahrt. Einen Tag vor Verwendung wird mit 3l 0,45M K_2HPO_4 pro 3/4l Gel (= eine Säulenfüllung), das in einem 3/4l Wasser aufgeschlämmt ist, mind. 8h bei Raumtemperatur von mind. 20°C unter vorsichtigen Rühren 'aktiviert', wobei nach Briggs et al./1972 vermutlich oberflächlich Mischkristalle mit Hydroxylapatit entstehen. Ferner werden zu 3/4l Gel 20g Hydroxylapatit-Pulver (Benckiser-Knapsack, Ladenburg/Neckar, DAB 6) zugesetzt, was die Kapazität der Säule weiter erhöht. Das so aktivierte Gel wird nach Dekantieren der überstehenden Lösung mit 70mM KPP/pH 6,8 in eine Säule (ø 10cm) geschlämmt. Man läßt das Gel vollständig absitzen und spült dann

mit 70mM KPP/pH 6,8 bis der pH-Wert des Eluats 7,0 erreicht (ca. 0l) und spült weiter mit 5mM KPP/pH 7,0 bis die Leitfähigkeit des Eluats 0,8mS beträgt (ca. 15l). Äquilibrieren und Chromatographie erfolgen bei maximaler Säulengeschwindigkeit.
Auf die so äquilibrierte Säule wird das G-50 Eluat (mit pH 7,0 und 4mS) aufgetragen. Mit 5mM KPP/pH 7,0 wird nachgespült bis die Transmission bei 280nm wieder auf 50% zurückgeht. Danach wird mit 300ml ges. NaCl-Lösung (110g NaCl/300ml) gespült und anschließend weiter mit 5mM KPP/pH 7,0 bis die Transmission bei 280nm wiederum auf 50% zurückgeht. Dann wird mit einem konvexen Gradienten (150ml : 150ml) von 5mM KPP/pH 7,0 nach 70mM KPP/pH 7,8 das Phytochrom abgelöst. Im ersten scharfen Peak (ca. 300ml) erhält man das Phytochrom. Das Brushite-Gel kann nicht regeneriert werden und wird verworfen. Während der gesamten Prozedur ist darauf zu achten, daß sich in dem sehr lockeren Gel keine Kanäle bilden!

2.9) Anionenaustauscherchromatographie an DEAE-Cellulose

Es erwies sich als günstig für die Ausbeute, die DEAE-Chromatographie in zwei nacheinanderfolgende Säulen zu zerlegen. Die erste Säule wird so betrieben, daß nur maximal 10% des Phytochroms gebunden wird; d.h.: alles, was leichter als Phytochrom gebunden wird, wird entfernt (negative Chromatographie). Auf der zweiten Säule wird Phytochrom gebunden; wenn man dann mit einem Gradienten ablöst, kommt mit dem ersten scharfen Peak Phytochrom (positive Chromatographie). Die beiden Säulen zusammen haben eine Ausbeute von 60%, während Standardwerte bei 25% liegen (vgl. Briggs et al./1972).
Für die negative Chromatographie wird vorgequollene Whatman DE-52 verwendet, die ungewöhnliche Durchflußgeschwindigkeiten ermöglicht (300ml/h). Eine Säule (ø 2,5cm, 30cm lang), wird mit 10mM Tris-Cl/pH 7,4, 10mM KCl, 1mM EDTA, 1mM NaN_3 äquilibriert. Das Brushite-Eluat wird nötigenfalls auf pH 7,4 eingestellt, mit 3M KCl auf 12mS einreguliert und durch die Säule gepumpt. Das Eluat enthält 80% des aufgetragenen Phytochroms in ca. 400ml.

Für die positive Chromatographie wird vorgequollene DEAE-Sepharose (von Pharmacia) verwendet, die eine besonders große Kapazität besitzt. Eine Säule (ø 2,5cm, 20cm lang) wird mit 10mM Tris-Cl/pH 7,4, 20mM KCl, 1mM EDTA, 1mM NaN_3 äquilibriert. Das DE-52 Eluat wird mit bidest.Wasser (ca. 1l) auf < 5mS gebracht und auf die Säule aufgetragen (100ml/h). Man spült mit 100ml Säulenpuffer nach und löst mit einem konvexen Gradienten (50ml : 50ml) von 20mM nach 250mM KCl in Tris-Cl/ pH 7,4, 1mM EDTA, 1mM NaN_3 ab (Eluat ca. 100ml). Die Ausbeute beträgt 70%; 50% der Ausbeute allein in ca.15ml Eluat. Weitere Konzentration bis auf 10ml Gesamtvolumen ist mit 50% ASF zu erreichen. - Die DEAE-Cellulosen werden nach Herstellervorschrift regeneriert.

2.10) Nachreinigung

Die oben beschriebene Reinigung von Phytochrom verläuft in der Praxis mit einer großen Bandbreite von Erfolgen und Mißerfolgen. Eine Rolle spielt hier sicherlich die unterschiedliche Qualität des Hafers (vgl. Punkt 2.6). Zudem scheint Phytochrom aufgrund seiner besonderen Empfindlichkeit (vgl. Punkt 2.2) selbst innerhalb der Proteinchemie ein besonders schwieriger Fall, was auch verschiedene Reviews, die sich mit der Präparation befassen, immer wieder einräumen müssen (Briggs und Rice/1972, Briggs et al./1972, Rüdiger/1972). Verläuft die Präparation gut, so ist die Hauptfraktion der zweiten DEAE-Säule nahezu rein (Reinheitsindex ca. 2); im Standard liegt dieser Index bei 6, im ungünstigsten Fall bei 10. Benötigt man reines Phytochrom, so ist in vielen Fällen eine mühselige Nachreinigung mit verlustreichen und wenig effektiven Schritten erforderlich, die im Folgenden kurz skizziert sei.

a) Kationenaustauscherchromatographie an CM-Sephadex

Man aktiviert 6g CM-Sephadex (G-50) von Sigma nach der Herstellervorschrift und äquilibriert das Gel in einer Säule (ø 2,5cm) mit 70mM KPP/pH 6,0. Die vereinigten DEAE-Sepharose Eluate von 3 Aufarbeitungen à 3kg Keimlinge (ca. 300ml) werden mit 50% ASF auf 30ml konzentriert (Resuspendierung in 70mM KPP/pH 7,8) und 12h gegen den Resuspendierungspuffer (1ol) dialysiert. Dann wird weitere 5h gegen 70mM KPP/pH 6,0 dialysiert und das Dia-

lysat mit 70mM KH_2PO_4 exakt auf pH 6,0 eingestellt. Diese Lösung wird auf die CM-Sephadex Säule aufgetragen (Laufgeschwindigkeit der Chromatographie 200ml/h). Phytochrom mit MG von 60000 (vgl. Punkt 2.1) wird zurückgehalten und scheint auf der Säule zu präzipitieren (möglicherweise wegen der Nähe des isoelektrischen Punkts, vgl. Balangé und Rollin/1973), während sich die Reste von Phytochrom mit MG von 240000 hier chromatographisch unterscheiden und im Vorlauf zu finden sind. Man spült mit 100ml 70mM KPP/pH 6,0 nach und löst mit 70mM KPP/pH 7,8 ab (Stufengradient). Die Ausbeute der Säule beträgt 50% bei einer nur 2 - 3fachen Anreicherung. Außerdem ist die Säule sehr kritisch in der Handhabung; ist der pH-Wert zu hoch, mißlingt die Chromatographie, ist er zu niedrig, sinken die Ausbeute und die Anreicherung weiter ab. Da die Säule bei einem pH-Wert betrieben wird, bei dem Phytochrom gerade noch stabil ist (vgl. Punkt 2.2), ist möglichst rasches Arbeiten geboten. Das Gel wird nicht regeneriert, sondern stets neu angesetzt.

b) Sephadex G-200 Chromatographie

Das CM-Sephadex Eluat (ca. 300ml) wird mit 50%iger ASF auf 10 ml konzentriert (in 10mM Tris-Cl/pH 7,6, 100mM KCl, 1mM EDTA, 1mM NaN_3) und auf eine mit demselben Puffer äquilibrierte Sephadex G-200 Säule (ø 5cm, 80cm lang) aufgetragen. Für die Chromatographie wird die Säule im freien Lauf von unten nach oben betrieben.

c) DEAE-Sephacel Chromatographie

Da vorgequollenes DEAE-Sephacel (Pharmacia) aus idealkugelförmigen Partikeln besteht, entsteht auf der Säule eine dichteste Kugelpackung, die nur sehr langsamen Durchfluß ermöglicht. Da zudem die Kapazität des Gels vergleichsweise gering ist, eignet es sich trotz optimaler Trenneigenschaften nur für kleine Mengen.

Das G-200 Eluat (ca. 150ml) wird mit bidest.Wasser auf < 5mS eingestellt und auf eine Säule (ø 1,6cm, 10cm lang) aufgetragen, die mit 10mM Tris-Cl/pH 7,4, 20mM KCl, 1mM EDTA, 1mM NaN_3 äquilibriert ist (Laufgeschwindigkeit 10ml/h). Man spült mit 20ml Säulenpuffer nach und löst mit einem konvexen Gradienten (10ml : 10ml) von 20mM nach 250mM KCl im obigen Puffer ab(Eluat 20ml). Das Gel wird nach Herstellervorschrift regeneriert.

d) Wiederholung der Brushite-Chromatographie
Man puffert das DEAE-Sephacel Eluat durch Dialyse gegen 5mM KPP/pH 7,0 um und trägt auf eine wie unter Punkt 2.8) hergestellte Brushite-Säule (ø 1cm, 5cm lang) auf; Chromatographie wie unter Punkt 2.8), aber ohne NaCl-Lsg. und mit entsprechend kleinem Gradienten (5ml : 5ml).
e) Wiederholung der G-200 Chromatographie
Das Eluat der Brushite-Chromatographie (ca. 10ml) wird mit 50%iger ASF auf 2ml konzentriert (in 10mM Tris-Cl/pH 7,6, 100mM KCl, 1mM EDTA, 1mM NaN_3), auf eine Sephadex G-200 Säule (ø 1,6cm, 50cm lang) aufgetragen und wie unter 2.10b) chromatographiert (Laufgeschwindigkeit 6ml/h). Man erhält Phytochrom in 20ml Eluat.
f) Affi-Gel-Blue Chromatographie
Smith/1979 berichtet, daß Phytochrom an Blaudextran bindet. Versuche nach den Angaben von Smith Phytochrom an Affi-Gel-Blue, 100 - 200 mesh (wet) von Bio-Rad (No. 153-7302) zu binden sind weitgehend mißlungen. Eine Versuchsreihe mit systematischer Variation der Bedingungen erbrachte dann folgendes Ergebnis: Phytochrom bindet in 50mM KPP/pH 7,8 (Leitfähigkeit < 5mS) an Affi-Gel-Blue (für 10 PE Auftrag wurde eine Säule ø 1,6cm, 10cm hoch gefüllt, verwendet). Durch Spülen mit 50mM KPP/pH 7,8 läßt sich ein großer Teil Fremdprotein entfernen. Zur vollständigen Ablösung von Phytochrom wird dann ein Gradient zu 3M KCl/10mM FMN in obigem Puffer angelegt. Danach muß das FMN rasch wieder entfernt werden, um eine Schädigung des Phytochroms zu vermeiden. Dies ist z.B. über eine nachfolgende P2-Biogel Säule möglich. Der Anreicherungsgrad der Säule beträgt 3 bis 4. Wenn die Entfernung des FMN rasch und vollständig erfolgt, ist dies eine Säule, die allein zur Nachreinigung ausreicht. Routinemäßige Erfahrung mit dieser Säule konnte noch nicht gesammelt werden, problematisch ist jedoch, daß FMN langsam an Phytochrom bindet, was durch Licht beschleunigt wird (vgl. Kapitel IV, Punkt 1, 6).

- Anreicherungsschema s.Tab.1)
- Elutionsdiagramme s.Abb.3 bis 8)

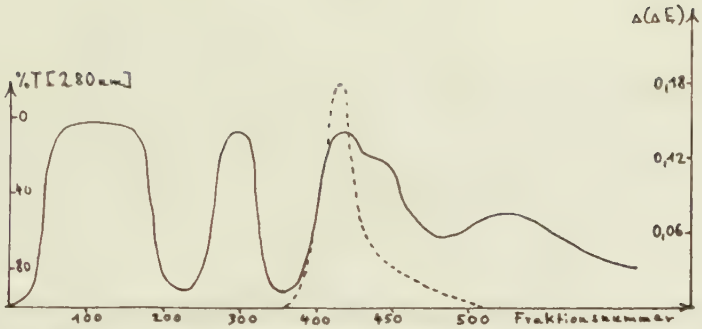


Abb.3) Elutionsdiagramm der Brushite-Chromatographie; gestrichelt: Phytochrom.

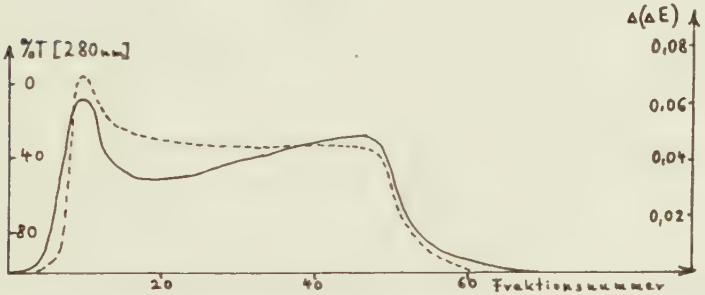


Abb.4) Elutionsdiagramm der DE-52-Chromatographie (negative Chromatographie); gestrichelt: Phytochrom.

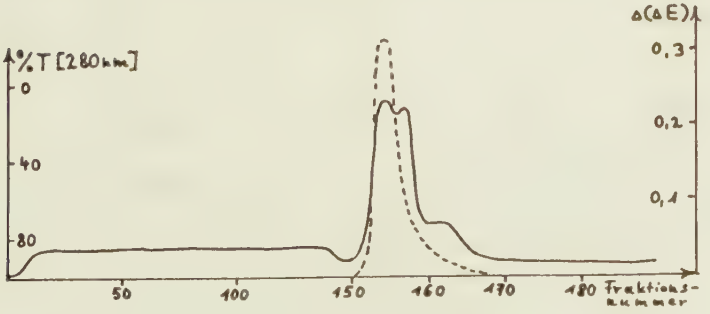


Abb.5) Elutionsdiagramm der DEAE-Sepharose-Chromatographie (positive Chromatographie); gestrichelt: Phytochrom.

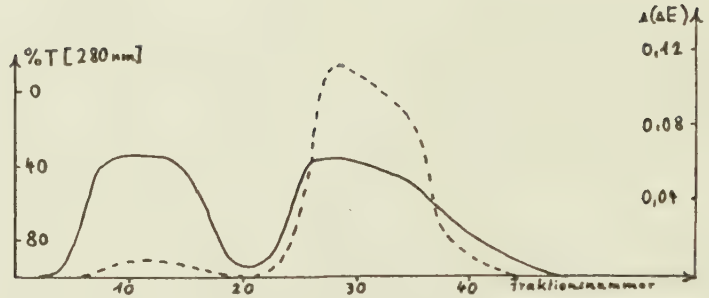


Abb.6) Elutionsdiagramm der CM-Sephadex-Chromatographie; gestrichelt: Phytochrom.

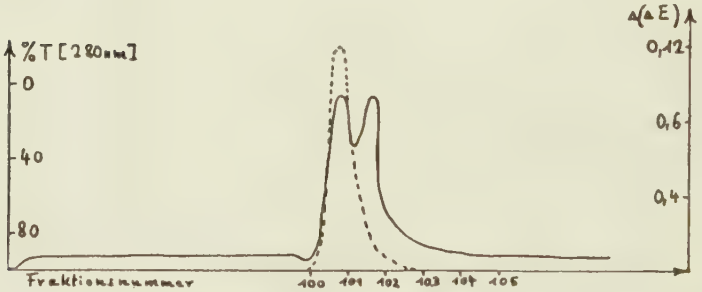


Abb.7) Elutionsdiagramm der DEAE-Sephacel-Chromatographie; gestrichelt: Phytochrom.

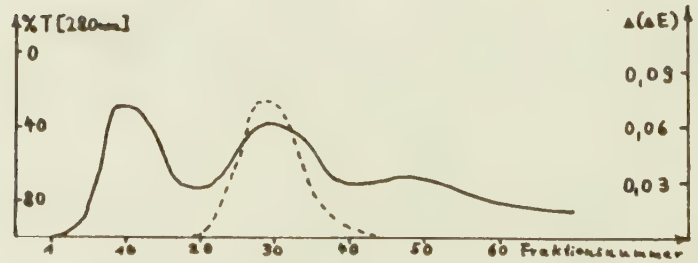


Abb.8) Elutionsdiagramm der G-200-Chromatographie; gestrichelt: Phytochrom.

2.11) Kontrolle des Molekulargewichts

Wie aus Abb.8) zu ersehen ist, erhält man bei einer G-200 Chromatographie Phytochrom deutlich getrennt vom Ausschlußvolumen; das Maximum von Phytochrom liegt bei einem Molekulargewicht von ca. 70000 Dalton und entspricht durch vergleichende Molekulargewichtsbestimmung mit anderen Methoden einem wahren Molekulargewicht von ca. 60000Dalton (Briggs et al./1972, Pike und Briggs/1972b, Rice und Briggs/1973, Rice et al./1973). Wie Rice et al./1973 nachgewiesen haben, entsteht das Phytochrom von 60000 Dalton als monomeres Abbauprodukt aus einem nativen Phytochrom von 240000 Dalton mit zwei Untereinheiten zu 120000 Dalton. Wenn man eine G-200 Chromatographie auf einer früheren Aufarbeitungsstufe durchführt, findet man in der Tat beide Formen nebeneinander, wie Abb.9) nach DEAE-Sepharose zeigt.
Das erste Phytochrommaximum, das jetzt auftaucht, zeigt ein scheinbares MG von ca. 350000 an, was nach obiger Analyse einem wahren MG von 240000 entspricht. Nach der Brushite-Chromatographie ist das Hauptprodukt noch hochmolekulares Phytochrom. Die genaue Bestimmung der beiden Maxima erfolgt mit einer G-200 Säule (ø 1,6cm, 50cm lang), die mit Dextranblau (MG > 800000), Katalase (240000), Rinderserumalbumin (67000) und Cytochrom C (12500) nach der Formel log MG = f (Fraktionsnummer) geeicht war (nach "Sephadex-Gelfiltration", Pharmacia, Uppsala, Herstellervorschrift). Die Laufgeschwindigkeit beträgt 6ml/h. Soweit es für die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente wichtig schien, wurden sie auch mit Phytochrom von MG = 240000 durchgeführt, wofür die Präparation etwas modifiziert werden mußte.

2.12) Präparation von Haferphytochrom mit MG = 240000

Um Phytochrom vom MG 240000 vor dem Abbau zum MG 60000 abzufangen, ist es notwendig die effektivsten Präparationsschritte möglichst rasch hintereinander durchzuführen. Wenn man das hier beschriebene Verfahren ohne Unterbrechungen durchzieht (ca.36h) erhält man in sehr guter Ausbeute hochmolekulares Phytochrom mit einem Reinheitsindex von 665nm : 280nm ca. 1 : 12, das in tiefgefrorener Lösung stabil ist; es gelang nicht, reines Haferphytochrom vom MG 240000 durch weitere Reinigung herzustellen, da stets Abbau zum MG 60000 erfolgte.

a) Herstellung eines Rohextrakts

1,5kg Haferkeimlinge werden mit 900ml Wasser, 100ml 0,5M Tris-

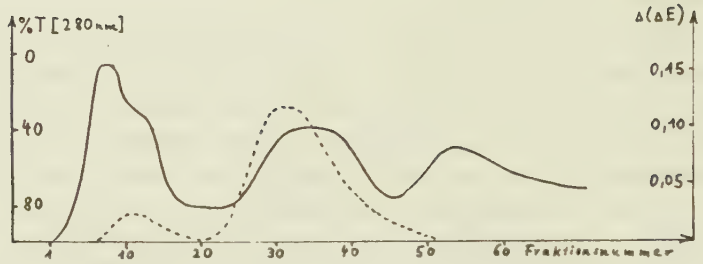


Abb.9) Elutionsdiagramm der G-200-Chromatographie direkt nach Brushite- und DEAE-Chromatographie; gestrichelt: Phytochrom.

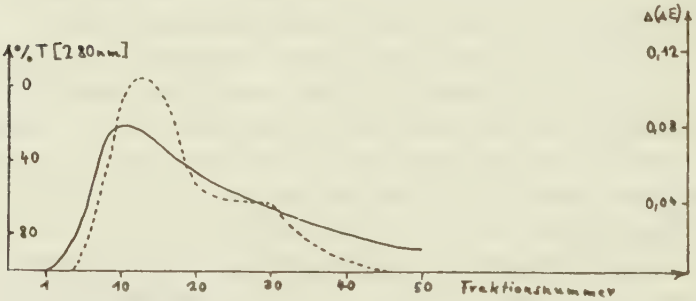


Abb.10) Elutionsdiagramm der G-200-Chromatographie zum Abschluß der Präparation von hochmolekularem Phytochrom; gestrichelt: Phytochrom.

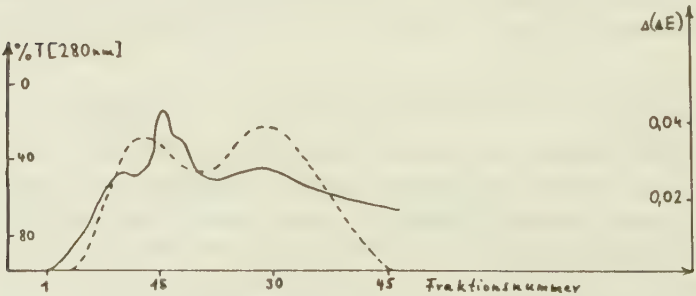


Abb.11) Elutionsdiagramm der G-200-Chromatographie mit den Nebenfraktionen der Präparation von hochmolekularem Phytochrom; gestrichelt: Phytochrom.

Cl/pH 8,5 und 30ml 1M Na_2SO_3 in einem 4l-Mixer bei ca. 4°C homogenisiert und in einem Leinensack mit einer 10l-Weinpresse ausgepreßt (ca. 2l). Das Filtrat wird sofort 30min. bei 43000g abzentrifugiert. Die Leitfähigkeit des Überstands wird nötigenfalls mit bidest.Wasser auf 4mS eingestellt; der pH-Wert wird mit 2n HCl auf 7,0 eingestellt; je 100ml RE werden 0,5ml einer 0,2M EDTA-Lsg. zugesetzt.

b) Brushite-Chromatographie

2l Brushite werden analog Punkt 2.8) aktiviert und zu je 1l in zwei Säulen (ø 10 cm) äquilibriert. Der RE wird ebenfalls halbiert und auf die beiden Säulen aufgetragen. Es wird mit 5mM KPP/pH 7,0 nachgespült bis die Transmission bei 280nm 50% erreicht, dann wird mit 70mM KPP/pH 7,8 im Stufengradienten abgelöst. Ausbeute: ca. 40%.

c) 33%ige Ammoniumsulfatfällung

Zu den vereinigten Brushite-Eluaten (ca. 500ml) gibt man langsam und unter Rühren 20g AS je 100ml zu, läßt 10min. weiter rühren und zentrifugiert 20min. bei 18000g ab. Der Niederschlag wird in 10mM Tris-Cl/pH 7,4, 10mM KCl, 1mM EDTA, 1mM NaN_3 resuspendiert (100ml) und nochmals bei 43000g 10min. abzentrifugiert. Der Überstand wird mit bidest.Wasser (ca. 1l) auf eine Leitfähigkeit von 3mS eingestellt. Ausbeute: ca. 80%.

d) Anionenaustauscherchromatographie an DEAE-Cellulose

Eine Säule (ø 1,6cm, 20cm lang) wird mit vorgequollener DEAE-Sepharose (Pharmacia) gefüllt und mit 10mM Tris-Cl/pH 7,4, 10mM KCl, 1mM EDTA, 1mM NaN_3 äquilibriert. Auf diese Säule wird das auf 3mS eingestellte Resuspendat der ASF aufgetragen (Laufgeschwindigkeit 250ml/h). Mit 100ml Säulenpuffer wird nachgespült, dann wird mit einem Stufengradienten (250mM KCl im Säulenpuffer) abgelöst. Ausbeute: ca.70%.

e) Sephadex G-200 Chromatographie

Die Hauptfraktion des DEAE-Eluats wird über eine kalibrierte G-200 Säule (ø 1,6cm, 50cm lang) gegeben (vgl. Punkt 2.11). Man erhält ein Elutionsdiagramm (Abb.10), das als Hauptprodukt Phytochrom mit MG = 240000 anzeigt. Eine Schulter am Ende des Phytochrompeaks deutet auf einen kleinen Anteil mit MG = 60000. Um sicher zu gehen, daß nur hochmolekulares Phytochrom gepoolt wird, werden nur die Hauptfraktionen gesammelt; das entspricht einer Ausbeute von ca. 50% bzw. bezogen auf den RE von 4% = 1,5 Phytochrom-Einheiten. Im Maximum hat dieses Phytochrom einen Reinheitsindex von ca. 9.

Wenn man die Nebenfraktionen mit einer 50%igen ASF auf 2ml konzentriert und nochmals auf die G-200 Säule aufträgt, ergibt sich nach 24h bei 4°C ein Elutionsdiagramm, das als Hauptprodukt niedermolekulares Phytochrom anzeigt (Abb.11). Hochmolekulares Phytochrom hingegen ergibt nach Auftauen und dreitägigem Stehen erst eine Verteilung von ca. 1 : 1.

2.13) Konzentration von Phytochromlösungen

Angereichertes Phytochrom läßt sich normalerweise mit 50% AS ausfällen. Sehr Dünne Lösungen (< 0,1mg/ml) können durch wiederholte Zugabe von trockenem Sephadex G-50 (1g/10ml) oder mit Ultrafiltration konzentriert werden. Bei der Ultrafiltration ist für niedermolekulares Phytochrom eine Filtergröße von 10000, für hochmolekulares eine Filtergröße von 100000 erforderlich, damit das längliche Phytochrom (Rice et al./ 1973) zurückgehalten wird.

2.14) Zusätzliche Reinheitsprüfung durch Gel-Elektrophorese

Niedermolekulares Phytochrom mit einem Reinheitsindex von 1,45 erwies sich in der Analyse mit Disc-Gelelektrophorese (nach Maurer/1971) als elektrophoretisch rein. Die nach Rice et al./ 1973 noch verbleibende Verunreinigung ist offenbar so geringfügig, daß in der Elektrophorese nur eine Bande zu sehen ist. Hochmolekulares Phytochrom mit einem Reinheitsindex von ca.9 ist nach Rice et al./1973 erst zu ca. 15% rein. Die Analyse mit SDS-Gelelektrophorese (nach Laemmli und Favre/1973) erbrachte eine scharfe Bande bei einem MG von ca. 120000 (= Untereinheit von 240000) und eine etwa 3cm lange schwach gefärbte Zone < 120000. Die SDS-Gelelektrophorese nach Weber und Osborne/1969 zeigte nur eine einzige Bande bei einem Molekulargewicht > 100000. Als Vergleichsproteine dienten a) Trypsin-Inhibitor, α - und ß-Untereinheit von PC (ca. 21000), b) Aldolase (ca. 40000) und c) Rinderserumalbumin (ca. 68000). Aus beiden Experimenten ergibt sich, daß die vorhandenen Verunreinigungen sehr unspezifisch sind, so daß das hier hergestellte hochmolekulare Phytochrom elektrophoretisch nahezu rein erscheint. Abb.12) zeigt die entsprechenden Gelröhrchen.

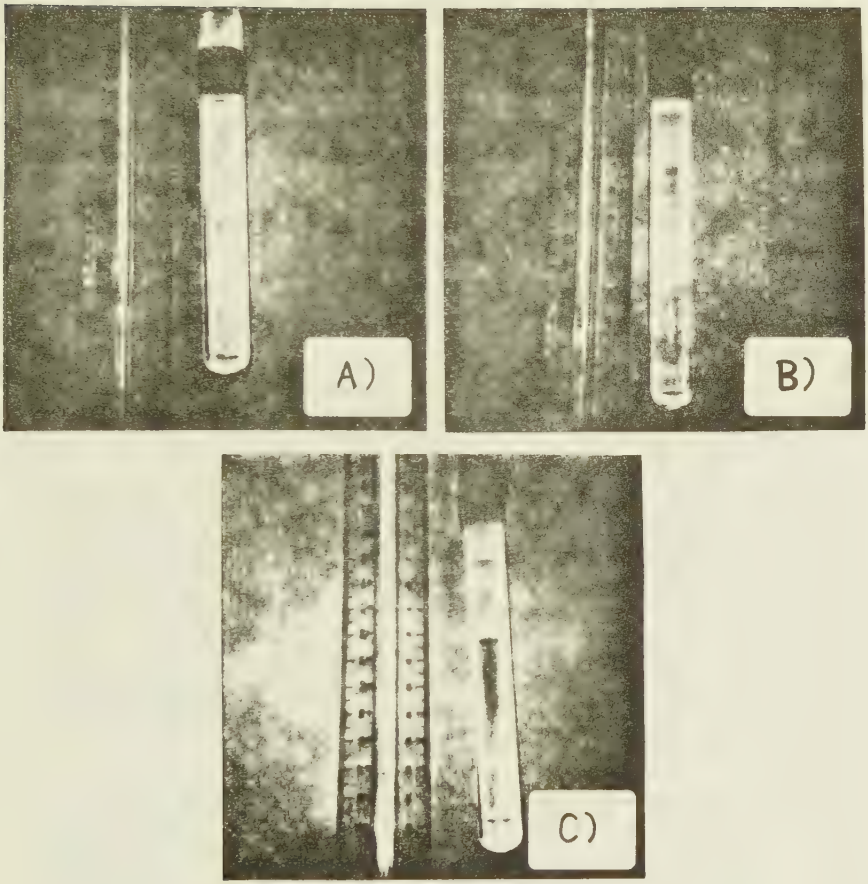


Abb.12) Gelröhrchen:
A) Disk-Gelelektrophorese von Phytochrom mit MG = 60000 und Reinheitsindex = 1,5;
B) Disk-Gelelektrophorese von Phytochrom mit MG = 60000 und Reinheitsindex = 10;
C) SDS-Gelelektrophorese (nach Laemmli und Favre/1973) von Phytochrom mit MG = 240000 und Reinheitsindex = 9;

3) Isolierung von C-Phycocyanin, Allophycocyanin und C-Phycoerythrin

PC und APC aus Spirulina platensis wurden nach dem von Kufer und Scheer/1979 beschriebenen Verfahren gereinigt; die Pigmente stellte Herr Dr.Kufer freundlicherweise zur Verfügung. Der Reinheitsgrad betrug $E_{vis/max} : E_{280} > 5$.
PE aus Fremyella diplosiphon wurde nach dem von Muckle und Rüdiger/1977 beschriebenen Verfahren gereinigt; das Pigment stellte Frau U.Lempert freundlicherweise zur Verfügung.Der Reinheitsgrad betrug $E_{vis/max} : E_{280} > 5$.

4) Darstellung von DHBV, PCB, PEB, PCT und einem Methanoladdukt an PCT

DHBV wurde nach einer von Krauss/1980 modifizierten Vorschrift (Cavaleiro und Smith/1973) dargestellt. Das für diese Arbeit verwendete DHBV wurde von Frau Dr.Krauss zur Verfügung gestellt. PCB wurde nach Gossauer und Hinze/1978, ein Diastereomerenpaar von PEB wurde nach Gossauer und Weller/1978, PCT nach Weller und Gossauer/1980 synthetisiert. Die Gallenfarbstoffe wurden von Prof.Dr.Gossauer freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Die Photoisomerisierung von PCB und PCT wurde nach Weller und Gossauer/1980 durchgeführt.
Methanoladdukt an die Vinylgruppe von Ring D des E-PCT:
46,6mg (76 µmol) E-PCT werden in 3ml wasserfreier TFA (Merck Art.Nr.8262) gelöst und nach Entfernen von Luft im Stickstoffstrom (ca.10min.) mit trockenem HBr behandelt (ca. 20min.). HBr und TCA werden anschließend im Stickstoffstrom entfernt. Der trockene Rückstand wird in 2ml frisch dest. Methanol aufgenommen und mit 20ml vorgekühlter 7,5%iger methanolischer Schwefelsäure versetzt (zur Wiederveresterung evt. verseiften Pigments). Das so gebildete Methanoladdukt wird in Dichlormethan überführt (3 x 1ml) und mit Wasser (4 x 5ml) von Säure- und Methanolresten befreit. Die Lösung wird mit wasserfreiem Na_2SO_4 getrocknet und im Stickstoffstrom auf ca. 1ml eingeengt. Diese Lösung wird auf 5 Dünnschichtplatten (20 x 20cm) aufgetragen, die mit Kieselgel (HPTLC, Merck) beschichtet sind. Die chromatographische Reinigung wird mit Tetrachlorkohlenstoff/Essig-

säureathylester (1 : 1/v : v) als Laufmittel durchgeführt. Die blauer Hauptbande (R_F = 0,27) wird mit Aceton eluiert (eine weiterlaufende schwach blaue Bande bleibt unberücksichtigt). Der Rückstand des Eluats ist reines Methanoladdukt (15,7mg = 24,5 µmol). Ausbeute: 34%.
UV/vis(Methanol): λ_{max}(lg ε) = 600nm(4,42), 370nm(4,65);
UV/vis(2%ige methanolische Salzsäure): 660nm(4,56), 370nm(4,59);
UV/vis(5 µmol Zinkacetat in Methanol): 635nm.
Massenspektroskopische und ^{1}H-NMR-spektroskopische Daten s. Kapitel III, Punkt 1.2.2.

5) Herstellung von Chromopeptiden

5.1) Peptide von P_r, C-Phycocyanin und C-Phycoerythrin

Zur Herstellung von peptischen Chromopeptiden wurde ein Verfahren von Fry und Mumford/1971 modifiziert. Zunächst wird eine möglichst konzentrierte Ausgangslösung an P_r (Reinheitsindex ca. 9) durch ASF hergestellt (eingesetzt wurden jeweils ca. 10 Phytochrom-Einheiten). Diese wird 24h gegen 10l 10mM Tris-Cl/pH 7,4, 10mM KCl, 1mM EDTA, 1mM NaN_3 (ohne jedes Reduktionsmittel!) dialysiert. Das Dialysat wird nochmals sättigend mit DR-Licht bestrahlt. Anschließend wird mit konzentrierter Ameisensäure versetzt bis zu einer 5%igen Endkonzentration, sowie Ascorbinsäure in 50mM Endkonzentration zugesetzt. Dann wird 1mg Pepsin/10mg Protein zugegeben und 3h bei 37°C inkubiert. Die so gewonnenen Peptide werden über eine Bio-Gel P4 Säule (ø 1,6cm, 30cm lang) gereinigt, die mit 5%iger Ameisensäure äquilibriert ist (Elutionsdiagramm s.Abb.13). Die blauen Fraktionen (20 bis 100) werden vereinigt. Ausbeute: 76%.
Um letzte Verunreinigungen zu beseitigen wird das P4-Eluat auf dreifaches Volumen mit bidest.Wasser verdünnt und auf eine Kieselgel-Säule (ø 1cm, 10cm lang) aufgetragen, die mit Kieselgel 60, Korngröße 0,063 - 0,2mm (Merck, Art.Nr.7754) gefüllt ist und mit 1%iger Ameisensäure äquilibriert ist. Auf dieser Säule wird das Chromopeptid als scharfe Zone festgehalten. Es wird mit 10%iger Essigsäure gespült bis die Transmission bei 280nm gegen 100% geht und mit 30%iger Essigsäure abgelöst. Ausbeute: 92%. Beide Säulen werden mit einer langsam laufenden Pumpe be-

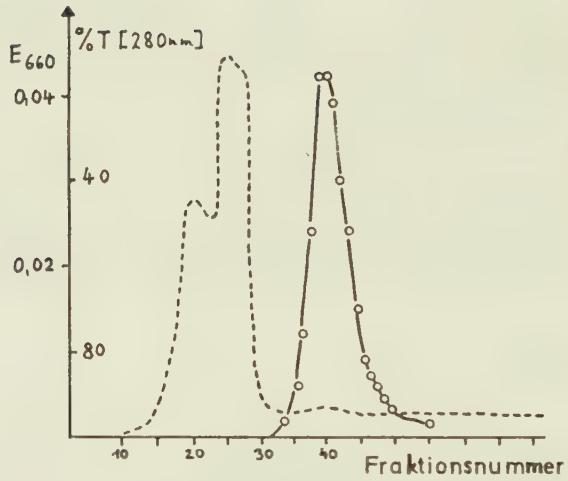


Abb.13) Elutionsdiagramm der P4-Chromatographie; durchgezogene Linie: P_r-Chromopeptid.

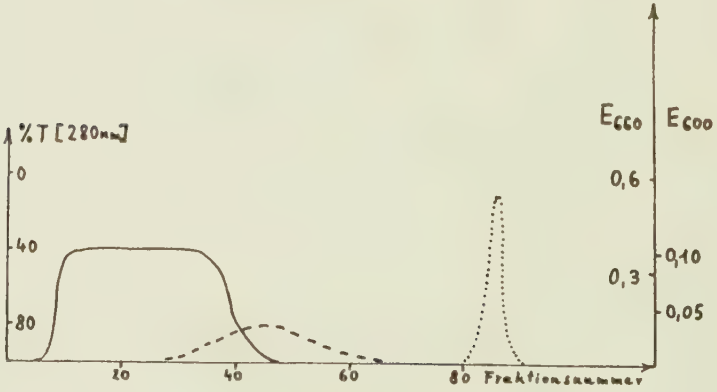


Abb.14) Elutionsdiagramm der P10-Chromatographie;
gestrichelt: P_{fr}-Chromopeptid;
gepunktet: P_r-Chromopeptid.

trieben. Die saure Lösung wird dann lyophilisiert mit einer Ausbeute von 71% (spektralphotometrisch bestimmt mit einem Aliquot von 5%).

Von PC und PE läßt sich auf analogem Weg Chromopeptid herstellen.

5.2) Peptide von P_{fr}

Zur Herstellung von peptischen Chromopeptiden des P_{fr} wird zunächst mit einer ASF eine möglichst konzentrierte Phytochromlösung hergestellt. Eingesetzt werden je ca. 10 Phytochrom-Einheiten mit einem Reinheitsindex von ca.9. Die Lösung wird 24h gegen 10l 10mM Tris-Cl/pH 7,4, 10mM KCl, 1mM EDTA, 1mM NaN_3 (ohne jedes Reduktionsmittel!) dialysiert. Das Dialysat wird sattigend mit HR-Licht bestrahlt (= 80% P_{fr} + 20% P_r) und sogleich mit konz.Ameisensäure versetzt bis zu einer 5%igen Endkonzentration; dabei und in allen folgenden Schritten ist peinlichst darauf zu achten, daß die Lösung nur Sicherheitslicht ausgesetzt wird und auch dies nur soweit es für die Manipulation an der Lösung unvermeidlich ist. Anschließend wird Ascorbinsäure bis zu einer 50mM Endkonzentration zugesetzt und 1mg Pepsin/10mg Protein zugegeben. Dann wird 2h bei 37°C inkubiert. Das so gewonnene Gemisch aus Chromopeptiden von sehr verschiedener Abbaugröße sowie von P_{fr} und P_r wird zunächst über eine Bio-Gel P10 Säule (ø 1,6cm, 30cm lang) gereinigt, die mit 0,1%iger Ameisensäure äquilibriert ist. Dazu wird das Peptidgemisch mit bidest. Wasser auf doppeltes Volumen gebracht und aufgetragen. Dann wird mit 0,1%iger Ameisensäure mit 20 Säulenvolumina gespült, wobei alles P_{fr}-Peptid auf der Rückseite eines in der Front laufenden Peaks bei 280nm von der Säule gewaschen wird. P_r-Peptid bleibt auf der Säule und wird mit 30%iger Essigsäure eluiert (s.Abb.14). Um reines P_{fr}-Peptid zu erhalten, wird das P10-Eluat, das nach dem Peak bei 280nm mit 0,1%iger Ameisensäure erhalten wurde, vereinigt; dieses Eluat enthält vollständig abgebautes P_{fr}-Peptid. Das Eluat wird auf eine Kieselgel-Säule (ø 1cm, 10cm lang) aufgetragen, die mit Kieselgel 60, Korngröße 0,063 - 0,2mm (Merck, Art.Nr. 7754) gefüllt und mit 0,1%iger Ameisensäure äquilibriert ist. Das P_{fr}-Peptid wird als scharfe Zone auf dem Gel zurückgehalten. Die Säule wird mit 5%iger Essigsäure gespült bis die

Transmission bei 280nm gegen 100% geht und mit 30%iger Essigsäure abgelöst. Beide Säulen werden mit einer langsam laufenden Pumpe betrieben.

6) Abspaltung und Isolierung von Chromophoren

6.1) Phycocyanobilin aus C-Phycocyanin

1mg C-Phycocyanin (von Spirulina platensis) wird nach Gefriertrocknung in 3ml wasserfreier TFA aufgelöst und mit Stickstoff gespült (ca. 10min.). Dann wird trockener HBr durchgeleitet (ca. 10min.) und anschließend mit Stickstoff zur Trockene eingeengt. Der Rückstand wird in 2ml vorgekühlter 7,5%iger methanolischer Schwefelsäure aufgenommen und zur Veresterung über Nacht bei -20°C aufbewahrt. Die Dimethylester werden in Dichlormethan überführt (3 x 1ml) und von Säure- und Methanolresten mit Wasser (4 x 5ml) befreit. Die Lösung wird mit wasserfreiem Na_2SO_4 getrocknet. Das Produkt wird auf eine Dünnschichtplatte aufgetragen (HPTLC Kieselgel-G Platten, Merck), mit Tetrachlorkohlenstoff/Essigsäureäthylester (1 : 1,v : v) als Laufmittel. Neben der Hauptbande von E-PCB (R_F = 0,35) erhält man eine Nebenbande von Z-PCB (R_F = 0,41).

6.2) Phycoerythrobilin aus C-Phycoerythrin

a) Man setzt für die Chromophorabspaltung Chromopeptide ein, die gemäß Muckle et al./1978 gewonnen sind. Die Chromophore werden mit siedendem Methanol abgespalten und zu den Dimethylestern umgesetzt wie von Köst/1974 beschrieben. Dünnschichtchromatographisch (durchgeführt wie oben) lassen sich zwei rote Hauptbanden aus Diastereomeren gewinnen (bei R_f-Werten von 0,18 und 0,22). Die getrennten Diastereomere wurden von Herrn Dr.Scheer freundlicherweise zur Verfügung gestellt.
b) Wenn man Chromopeptide gemäß Kapitel II, Punkt 5.1) einsetzt und die Abspaltung analog Punkt 6.1) durchführt, erhält man dasselbe Diastereomerengemisch wie unter a).

6.3) Phytochromobilin aus peptischem P_r-Chromopeptid

60nM des blauen Lyophilisats des P_r-Chromopeptids (s.Kapitel II, Punkt 5.1) werden in 3ml wasserfreier TFA gelöst, 10min. mit Stickstoff gespült und dann 10min. mit trockenem HBr behandelt. Die Lösung wird bei dieser Behandlung gelblich. HBr und TFA wer-

den dann im Stickstoffstrom entfernt, wobei die Färbung grünlich wird. Der Rückstand wird in 2ml vorgekühlter 7,5%iger methanolischer Schwefelsäure aufgenommen, wobei die ursprüngliche blaue Farbe sich wieder einstellt. Die Lösung wird zur Veresterung über Nacht bei -20°C gelagert. Die Dimethylester werden in Dichlormethan überführt (3 x 1ml), Säure- und Methanolreste werden mit Wasser entfernt (4 x 5ml). Die Lösung wird mit wasserfreiem Na_2SO_4 getrocknet. Ausbeute: 15nM (25%) verestertes Produkt, das gemäß Dünnschicht-Analyse (durchgeführt wie oben) aus E-PCT (R_F = 0,40) und dem Methanol-Addukt an die Vinylgruppe von Ring D des E-PCT (R_F = 0,27) besteht (Vgl. Kapitel II, Punkt 4). Die Ausbeutebestimmung basiert auf den Extinktionskoeffizienten.

7) Durchführung der Denaturierung nativer Pigmente

Die Denaturierung von Biliproteiden mit Hilfe von Harnstoff wurde in Thunberg-Küvetten unter Stickstoff durchgeführt. 2ml 10M Harnstofflsg. (Merck, Art.Nr.8488), die mit konz. HCl auf einen pH-Wert < 2 gebracht sind, werden in die Thunbergküvette gegeben, 0,5ml pigmenthaltiger Lösung in den Seitenarm. Nach wiederholtem Evakuieren der Küvette und Spülen mit Stickstoff werden die Lösungen unter Stickstoff gemischt und sofort photometrisch vermessen. Phytochromlösungen werden im Seitenarm saturierend belichtet und dann unter Sicherheitslicht mit der Harnstofflösung gemischt. Der pH-Wert der Mischungen wird nach den Spektralmessungen mit einem pH-Meter (Fa.Knick) kontrolliert. Die 8M Endkonzentration an Harnstoff garantiert vollständige Denaturierung von Biliproteiden (Langer et al./1980).

8) Dünnschichtchromatographie

DC wurde ausschließlich auf HPTLC Kieselgel-G Platten (Merck, Darmstadt) durchgeführt mit den Laufmitteln 1 : 1, v : v, Tetrachlorkohlenstoff/Essigester für analytisches und quantitatives Arbeiten und 1 : 1, v : v, Tetrachlorkohlenstoff/Eisessig für sehr empfindliche analytische Nachweise.

9) Durchführung kinetischer Messungen

9.1) pH-Wert und Lösung

Phytochromlösungen werden für kinetische Messungen in einem 10mM Tris-Cl-Puffer/pH 7,4, 10mM KCl, 1mM EDTA, 1mM NaN_3 gebracht. Die gewünschten pH-Werte werden mit folgenden Lösungen eingestellt: 500mM Tris-Cl/pH 8,5, 100mM Acetat-Puffer/pH 5,5, bzw. 1n KOH und 1n HCl. Die Kinetiken erwiesen sich von den verwendeten Ionen unabhängig. Der pH-Wert von Glycerin/Puffer-Gemischen (1 : 1/v : v) wird vor Zugabe des Glycerins eingestellt und nach Zugabe nötigenfalls nachkorrigiert. Das verwendete Glycerin (Merck, Art.Nr.4094) absobiert im Sichtbaren nicht. Für Kinetiken mit reduzierenden Agentien wird das Reduktionsmittel aus einer konz. Stammlösung, deren pH-Wert vorher auf ca. 6 - 8 einreguliert ist, direkt vor der Messung mit einer Eppendorf-Pipette zugesetzt; die Messungen wurden mit maximal 50mM Konzentrationen an Reduktionsmittel durchgeführt, was den eingestellten pH-Wert der Lösung nur innerhalb eines Toleranzbereichs von $\pm$ 0,1 pH-Einheit verändert. Die fertige Lösung wird nötigenfalls vor der Messung 20min. bei 40000g abzentrifugiert.

9.2) Messung

Die Kinetiken wurden in dem Spektralphotometer DMR 22 (s.Kapitel II, Punkt 1.1.1) bei vorher einregulierter Temperatur gemessen; der Küvettenraum wird mit nachgetrockneter Druckluft gespült. Zuerst wird das Absorptionsspektrum von P_r und P_{fr} und $\Delta(\Delta E)$-Wert der Ausgangslösung bestimmt. Anschließend wird die zu messende Probe fertiggemacht und davon nochmals das Spektrum in der P_r-Form kontrolliert, das mit dem Spektrum der Ausgangslösung weitestgehend übereinstimmen muß. Alle folgenden Messungen werden im gespreizten Meßbereich von 0,1 Extinktionseinheit pro Skalenhöhe mit einer Schreibergeschwindigkeit von 30mm/min, einer hohen Dämpfung (Dämpfungsstufe 1 $\triangleq$ 1sec. für Einstellung auf 99,5% des Endwerts) und einer mittleren Verstärkung (Verstärkungsstufe 1.3, d.i. 3,5fach verstärkt gegenüber dem Grundniveau) registriert. Zunächst werden die zu messenden Wellenlängen in der P_r-Form registriert (420, 580, 660, 665, 698, 710, 720, 730 und 800nm). Danach erfolgt die Phototransformation zu

P_{fr}. Um den Beginn einer kinetischen Messung möglichst genau am photostationären Gleichgewicht zur Zeit t = 0 zu erhalten, wurde vor jeder Messung nochmals 30sec. mit HR-Licht eingestrahlt und unmittelbar nach Ende der Belichtung die Kinetik gemessen. Um die Stabilität des zu messenden Systems zu prüfen, wird vor und nach jeder Meßreihe bei 800nm gemessen; diese Wellenlänge bleibt in normaler Phytochromlösung von der Phototransformation weitestgehend unberührt und dient zur Kontrolle des Systems. Zum Abschluß werden die Kontrollmessungen in der P_r-Form nochmals wiederholt: P_r-Werte von 420, 580, 660, 665, 698, 710, 720, 730 und 800nm und P_r-Spektrum. Danach wird der pH-Wert nochmals überprüft.

9.3) Auswertung

Wenn man gemäß der bisherigen Literatur (Correll et al./1968b, Pike und Briggs/1972a) davon ausgeht, daß die Kinetik eine vollständige Umwandlung von P_{fr} nach P_r liefert mit zwei sich überschneidenden Komponenten erster Ordnung, einer schnellen Komponente mit der Geschwindigkeitskonstante k_s und einer langsamen mit der Geschwindigkeitskonstante k_l, ergibt sich:

$$\Delta E_t = \Delta E_0 \left(\frac{\% \text{ langs. Komp.}}{100} e^{-k_l t} + \frac{\% \text{ schnelle Komp.}}{100} e^{-k_s t} \right),$$

wobei ΔE_x die Extinktionsdifferenz zwischen P_r und P_{fr} zur Zeit t = x ist. Da die schnelle Komponente nach ca. 6min. abgeklungen ist, kann ab diesem Zeitpunkt die Auswertung der langsamen Kinetik zugeordnet werden. (Vernachlässigt bleibt dabei die sehr langsame Kinetik, die für die mathematische Beschreibung des kinetischen Verlaufs für mittlere Werte erst nach ca. 5 h nötig ist.) Aus diesen Werten läßt sich die Geschwindigkeitskonstante bzw. Halbwertszeit und der Nullpunkt der langsamen Komponente ermitteln. Aus der Differenz zwischen den Werten, die sich für die langsame Komponente im Bereich der ersten 6min. ergeben, und der Totaldifferenz während dieses Zeitraums ergeben sich die Werte für die schnelle Komponente in diesem Bereich, die dann ebenfalls nach Kinetik 1.Ordnung ausgewertet werden. Die Ermittlung des Nullpunkts der Kinetiken geschieht entweder grafisch oder mit einem programmierbaren Rechner (s.Kapitel II, Punkt 1.6).

Einige Kinetiken wurden sowohl grafisch als auch mit dem Rechner ausgewertet. Da ein grafisches Verfahren zeitaufwendiger ist und keine besseren Ergebnisse liefert als ein Rechner wurden die meisten Kinetiken mit dem Rechner ausgewertet (Ermittlung von Steigung und Nullpunkt).
Da sich im Verlauf der Arbeit erwies, daß der Endpunkt der Kinetik nicht 100% P_r ist, sondern - je nach Bedingungen schwankend - niedriger liegt, ergeben sich auf Basis anderer Endpunkte folgende Variationen.
Ist der Endpunkt 100% P_r-Bildung beträgt ΔE_o bei 665nm : $E_{P_r/665}$ (= Endpunkt) - $E_{P_{fr}/665(t=0)}$.
Ist der Endpunkt aber beispielsweise nur durch eine Revertierungsrate von X% von 100% definiert, ergibt sich für den Endpunkt numerisch:

$$E_{P_{fr}/665(t=0)} + \frac{E_{P_r/665} - E_{P_{fr}/665(t=0)}}{100\%} \times X\%$$

$\Delta E_o'$ beträgt dann:

$$\left(E_{P_{fr}/665(t=0)} + \frac{E_{P_r/665} - E_{P_{fr}/665(t=0)}}{100\%} \times X\% \right) \text{ (= Endpunkt) } -$$

$$E_{P_{fr}/665(t=0)} = \frac{E_{P_r/665} - E_{P_{fr}/665(t=0)}}{100\%} \times X\%$$

Und da - wie aus dem Phytochromspektrum ersichtlich - ferner gilt: $E_{P_{fr}/665(t=0)} \approx 1/2\ E_{P_r/665}$ vereinfacht sich dies zu:

$$\text{Endpunkt} \approx \frac{E_{P_r/665}}{100\%} (50\% + X/2\%) \text{ und } \Delta E_o' \approx \frac{E_{P_r/665}}{200\%} \times X\%$$

Entsprechend ändert sich ΔE_t.

$$\Delta E_t' = \left(E_{P_{fr}/665(t=0)} + \frac{E_{P_r/665} - E_{P_{fr}/665(t=0)}}{100\%} \times X\%\right) \text{(= Endpkt.)}$$

$$- E_{P_{fr}/665(t)}$$

$$\text{Bzw.: } \Delta E_t' \approx E_{P_r/665}\left(1/2 + \frac{X\%}{200\%}\right) - E_{P_{fr}/665(t)}$$

Dies gilt für Kinetiken mit Extinktionszunahme.
Kinetiken mit Extinktionsabnahme seien exemplarisch an der Wellenlänge 730nm dargestellt. Ist der Endpunkt 100% P_r-Bildung, beträgt ΔE_o bei 730nm: $E_{P_{fr}/730(t=0)} - E_{P_r/730}$ (= Endpunkt).

Liegt dem Endpunkt aber nur eine Revertierungsrate von X% zugrunde, ergibt sich für den Endpunkt numerisch:

$$(E_{P_{fr}/730(t=0)} - E_{P_r/730}) - \frac{E_{P_{fr}/730(t=0)} - E_{P_r/730}}{100\%} \times X\% + E_{P_r/730}$$

$$= \frac{\Delta E_o}{100\%} (100\% - X\%) + E_{P_r/730}$$

Es gilt dann für $\Delta E_o'$:

$$E_{P_{fr}/730(t=0)} - \frac{\Delta E_o}{100\%} (100\% - X\%) - E_{P_r/730} =$$

$$\Delta E_o - \frac{\Delta E_o}{100\%} (100\% - X\%) = \frac{\Delta E_o}{100\%} \times X\%$$

Insgesamt werden die Kinetiken durch eine solche Korrektur schneller.

Das oben dargestellte Verfahren zur Umrechnung auf neue Endpunkte der Kinetik ist ziemlich zeitaufwendig,da mit dem neuen Endpunkt sämtliche Einzelwerte neu durchgerechnet werden müssen. Ein wesentlich einfacheres Verfahren sei im Folgenden dargestellt.

Für die Geschwindigkeitskonstante gilt:

$$k = \ln \frac{IX_1 - X_tI}{IX_1 - X_oI} \; 1/t, \text{ wobei}$$

X_1 = Endpunkt
X_o = Meßwert zur Zeit t=0, Nullpunkt
X_t = Meßwert zur Zeit t

Für eine Kinetik mit neuem Endpunkt (und entsprechend neuem Nullpunkt) gilt:

$$k' = \ln \frac{IX_1' - X_tI}{IX_1' - X_o'I} \; 1/t$$

Unverändert bleibt die Zuordnung von Zeit = t zu Meßwert = X_t. Da aber bei einer Kinetik, deren Meßpunkte im Bereich von Minuten liegen und deren Endpunkt im Bereich von Tagen liegt gilt: $(X_o - X_o') \longrightarrow 0$, läßt sich substituieren:

$$k' \approx \ln \frac{IX_1' - X_tI}{IX_1' - X_oI} \; 1/t$$

Da ferner die Kinetik mit Endpunkt 100% aus den Meßwerten von 5 bis 17min. errechnet wurde, stimmen die Meßwerte und die rechnerischen Meßwerte im mittleren Bereich um 10min. optimal überein. Deshalb kann man den 10min.-Wert für die Errechnung

von k' einsetzen.

$$k' \approx \ln \frac{|X_1' - X_{10min.}|}{|X_1' - X_o|} \quad 1/10min.$$

Für $X_{10min.}$ gilt aber a) bei Extinktionszunahme (z.B.665nm):

a) $X_{10min.} = X_1 - (X_1 - X_o)\, e^{k10min.}$

und b) bei Extinktionsabnahme (z.B.730nm):

b) $X_{10min.} = X_1 + (X_o - X_1)\, e^{k10min.}$

Die Richtigkeit dieses Kalküls läßt sich auch im Vergleich mit der detaillierten Rechnung nach dem ersteren Schema bestätigen. Da eine Kinetik aber nicht durch die absoluten Meßwerte, sondern durch deren relatives Verhältnis definiert ist, kann man statt der Absolutwerte auch Prozentwerte substituieren.

Es gilt für a):

$X_o = 0\%$

$X_1 = 100\%$

$X_1' = y\%$

$X_{10min.} = 100\% - 100\%\, e^{k10min.}$

$$k' \approx \left(\ln \frac{y - X_{10min.}}{y}\right) 1/10min.$$

$$k' \approx \left(\ln \frac{y - 100 + 100\, e^{k600sec.}}{y}\right) 1/600sec.$$

ebenso für b):

$X_1 = 0\%$

$X_o = 100\%$

$X_1' = 100\% - y\%$

$X_{10min.} = 100\%\, e^{k10min.}$

$$k' \approx \left(\ln \frac{y - 100 + 100\, e^{k600sec.}}{y}\right) \quad 1/600sec.$$

Anm.: Da die hier eingerechneten Werte sich auf die nach 600sec. positiv verbleibenden Extinktionswerte beziehen, muß das Vorzeichen von k in dieser Rechnung stets plus sein.

Auf diese Art und Weise läßt sich ein bekannter k-Wert direkt auf variable Endpunkte zu y% des ΔE_o umrechnen. Diese Rechnung beschränkt sich auf die langsame kinetische Komponente, die dabei schneller wird. Die schnelle kinetische Komponente sollte durch diese Verschiebung etwas langsamer werden; in der detaillierten Rechnung ist dies so geringfügig, daß es vernachlässigt werden kann.

9.4) Einige Meßprobleme

Phytochrom ist ein außerordentlich empfindliches Biliproteid (vgl. Kapitel II, Punkt 2.2). Messungen, die bei 25°C gemacht werden oder Messungen, die außerhalb des pH-Bereiches von 6 bis 8 liegen, setzen Phytochrom Bedingungen aus, bei denen es nicht mehr beliebig stabil ist; Phytochrom denaturiert und es treten leicht Trübungen auf. Unter solchen Bedingungen ist deshalb rasches Arbeiten und häufiger Probenwechsel erforderlich. Deswegen sind diese Ergebnisse mit besonderer Vorsicht zu beurteilen, da neben den normalen Meßschwankungen systematische Fehlerquellen vorliegen. Es sind deshalb auch solche Ergebnisse, die bei höherer Temperatur nach Tagen (Anderson et al./1969, Correll et al./1968b) oder solche, die bei extremen pH-Werten (Anderson et al./1969) beobachtet wurden, sehr problematisch; hier setzen Denaturierungsphänomene ein, die die Dunkelrelaxation bei weitem überkompensieren.

III) DIE PHYTOCHROM-CHROMOPHORE IN DER P_r- UND DER P_{fr}-FORM

1) Der P_r-Chromophor

1.1) Extinktionskoeffizient von P_r. Chromophorzahl

1.1.1) Stand der Forschung

Wie Smith/1975 ausführt, wird zwar vermutet, daß Phytochrom mit dem MG = 60000, bzw. pro Untereinheit (MG = 120000) nur einen Chromophor besitzt, doch ist seit Correll et al./1968b die Frage nach der Chromophorzahl aufgeworfen, dies nach wie vor unbewiesen. Der Extinktionskoeffizient von Phytochrom in der P_r-Form, in der die Konzentration von Phytochrom sinnvollerweise definiert wird, da sie die stabilere Form ist, wurde wiederholt mit sehr widersprüchlichen Ergebnissen bestimmt. Mumford und Jenner/1966 bestimmten in einem Phytochrom mit MG = 60000 $\varepsilon_{P_r max}$ zu 76000 bei einem Reinheitsindex von 1,08; da Hopkins und Butler/1970 und Rice et al./1973 für ihre reinste Fraktion von niedermolekularem Phytochrom einen Reinheitsindex von 0,78 fanden, ergäbe sich umgerechnet ein Wert von 105000. Tobin und Briggs/1973 bestimmten für dimeres hochmolekulares Phytochrom $\varepsilon_{P_r max}$ zu 70000 pro Untereinheit, bzw. zu 140000 für das Dimere(Reinheitsindex von 1,29); Hunt und Pratt/1979 ermittelten für das hochmolekulare Phytochrom einen Reinheitsindex von 1,15, woraus sich $\varepsilon_{P_r max}$ zu 78000 resp. 156000 hochrechnen läßt. Burke et al./1972 berechneten durch den Vergleich von Biliverdin und dem Phytochrom-Intermediat P_{bl} (nach neuerer Nomenklatur meta Rb, vgl. Kap.IV, Punkt 1.1.2) $\varepsilon_{P_r max}$ zu 150000 pro Chromophor, wenngleich Biliverdin und P_{bl}, dessen Struktur unbekannt ist, nicht besonders geeignete Modellsubstanzen für P_r sind. Nach Mumford und Jenner/1966 hat die blaue Bande ε_{380} = 26000; dieselbe Hochrechnung wie oben ergibt einen Wert von 36000.

In dieser Arbeit wird natives Phytochrom mit MG = 60000 mit den Produkten verglichen, die man bei vollständiger Entfaltung des Proteins oder bei proteolytischem Abbau des Proteins erhält, deren Extinktionskoeffizienten hinlänglich genau bekannt sind; dies läß gleichzeitig die Entscheidung zu, ob Phytochrom einen oder zwei Chromophore hat (für PE wurde dies bereits früher mit Erfolg von Muckle und Rüdiger/1977) durchgeführt.

Die nachfolgenden Messungen beziehen sich auf Raumtemperatur.

1.1.2) Quantitative Denaturierung von C-Phycocyanin, Allophycocyanin und P_r

Das Verfahren wurde zunächst an PC und APC als geeigneten Vergleichssubstanzen für Phytochrom getestet, indem die reinen Pigmente bei pH 2,0 unter Stickstoff zu den Chromophor-Kationen denaturiert wurden. Die Ergebnisse (unter rechnerischer Berücksichtigung von Verfahrensfaktoren wie Volumenänderung) sind in Tab.3a) zusammengefaßt für die kurzwelligen und langwelligen Maxima. Nach Glazer und Fang/1973 ergeben sich für die Chromophor-Kationen des Phycocyanin-Typs Extinktionswerte von 35500 im Langwelligen und von 34700 im Kurzwelligen; diese Extinktionskoeffizienten bleiben bei Anwesenheit von 6M Harnstoff/pH 2,0 - wie in einem unabhängigen Experiment überprüft wurde - unverändert. Die, mit den aus der Denaturierung erhaltenen Faktoren hochgerechneten Extinktionskoeffizenten pro nativer Chromophor betragen bei 620 bzw. 650nm 103000 und bei 360 bzw. 350nm ca. 20000; nach Boussiba und Richmond/1979 errechnet sich in guter Übereinstimmung für PC ε_{620} = 107000.
Eine zusätzliche Bekräftigung dieser Resultate ist die Renaturierung der bei pH 7 entfalteten Biliproteide, indem der Harnstoff z.B. über eine Biogel P2 Säule entfernt wird.
Die Entfaltung von Phytochrom ließ sich bislang nicht revertieren, aber da die Entfaltung unter denselben Bedingungen ausgeführt wurde wie oben, darf man gleiche Verhältnisse für den Chromophor annehmen. Es wurde Phytochrom verwendet, das einen Reinheitsindex von mind.2 hatte, also im Sichtbaren und nahen UV rein war. Nach Fry und Mumford/1971 hat das entfaltete Chromophor-Kation im Chromopeptid im langwelligen Maximum ε = 32000 und im kurzwelligen Maximum ε = 40000; diese Extinktionskoeffizienten bleiben bei Anwesenheit von 6M Harnstoff/pH 2,0 - wie in einem unabhängigen Experiment überprüft wurde - unverändert. Die Ergebnisse sind in Tab.3b) zusammengefaßt.

1.1.3) Quantitativer Peptidabbau von C-Phycocyanin und P_r

Das Verfahren wurde zunächst mit PC getestet. Bei vollständigem peptischem Abbau von PC zum Chromopeptid-Kation (vgl. Kapitel

II, Punkt 5.1) zeigt die rechnerische Auswertung, daß sich im Langwelligen derselbe Faktor 2,9 für das Verhältnis natives Pigment/Chromopeptid ergibt wie für natives Pigment/denaturiertes Pigment. Man kann daraus schließen, daß der Abbau quantitativ ist (100% Ausbeute). Ob dies für das empfindlichere P_r in vollem Umfang zutrifft ist nicht sicher; die Rechnung selbst unterstellt auch für Phytochrom 100% Ausbeute. Die Ergebnisse sind in Tab.3) zusammengefaßt.

1.1.4) Diskussion

Die hier gefundenen Werte für den Extinktionskoeffizenten von P_r liegen in der Größenordnung wie sie sich bei Tobin und Briggs/1973 für das Dimere mit MG = 240000 ergeben (ε =140000) oder bei Mumford und Jenner/1966,wenn man den dort angegebenen Wert für niedermolekulares Phytochrom auf eine extrem reine Probe hochrechnet (ε = 105000). Insgesamt ergäbe sich daraus aber, daß Phytochrom als hochmolekulares Dimeres nur einen Chromophor hat; mit Sicherheit kann dies für das hier untersuchte niedermolekulare Phytochrom (MG = 60000) gesagt werden. Dies würde implizieren, daß die biochemisch bislang als identisch geltenden Untereinheiten zu 120000Dalton (Correll et al./1968c, Rice et al./1973) sich zumindest im Chromophorgehalt unterscheiden. Weiterhin muß man dann erwarten, daß analog zu dem niedermolekularen Phytochrom mit MG = 60000, das durch endogene Proteasen aus dem Phytochrom mit MG = 120000 gebildet wird, ein ähnliches, aber chromophorloses Bruchstück zu 60000 Dalton aus der chromophorlosen Untereinheit zu 120000Dalton entsteht. Ein solches Bruchstück dürfte sich präparativ sehr schwer abtrennen lassen, was einige Probleme der Phytochrom-Reinigung erklären würde. Die letztendliche Klärung ist aber nur möglich, wenn man das experimentell an reinem hochmolekularem Phytochrom zeigen kann.
Die Analyse tryptischer Peptide ergab bezüglich ihrer Sequenzen und ihrer Aminosäurezusammensetzung eine hohe Symmetrie sowohl der Untereinheiten zu 120000Dalton wie auch des niedermolekularen Phytochroms zu 60000Dalton (Stoker et al./1978a,

Tab.3) Spektraldaten von nativem, denaturiertem und proteolytisch abgebautem PC, APC und P_r. Native Spektren in Puffer (10mM Tris-Cl/pH 7,4, 10mM KCl, 1mM ETDA, 1mM NaN_3) im Vergleich mit Spektren nach quantitativer Denaturierung in 8M Harnstoff:pH 2 oder nach quantitativem Pepsinabbau bei pH 2. Rechnung auf Basis von 3 Chromophoren pro PC-(APC-) Monomer.
a) nach Glazer und Fang/1973 b) nach Fry und Mumford/1971
c) nicht bestimmt wegen der hohen Hintergrundabsorption in diesem Spektralbereich

Tab.3a) PC und APC	langwelliges Maximum	kurzwelliges Maximum
ε pro Chromophor in denat.Zustand (Kation)[a]	665nm: 35500 (l/Mxcm)	355nm: 34700 (l/Mxcm)
PC: $E_{nativ}/E_{denat.Kation}$	620/665nm: 2,9 ± 0,2 (n = 4)	360/355nm: 0,55 ± 0,03 (n = 4)
ε pro nativer Chromophor (errechnet aus der Denaturierung von PC)	620nm: 103000 ± 7000 (l/Mxcm)	360nm: 19000 ± 1000 (l/Mxcm)
APC: $E_{nativ}/E_{denat.Kation}$	650/665nm: 2,9 ± 0,2 (n = 2)	350/355nm: 0,6 ± 0,03 (n = 2)
ε pro nativer Chromophor (errechnet aus der Denaturierung von APC)	650nm: 103000 ± 7000 (l/Mxcm)	350nm: 21000 ± 1000 (l/Mxcm)
PC: $E_{nativ}/E_{Chromopeptid\ (Kation)}$	620/650nm: 2,9 ± 0,1 (n = 2)	nicht bestimmt[c]
ε pro nativer Chromophor (errechnet aus der Proteolyse von PC)	620nm: 103000 ± 3500 (l/Mxcm)	-

Tab.3b) P_r	langwelliges Maximum	kurzwelliges Maximum
ε pro Chromophor im Chromopeptid (Kation)[b]	660nm: 32000 (l/Mxcm)	370nm: 40000 (l/Mxcm)
$E_{nativ}/E_{denat.Kation}$	665/680nm: 3,4 ± 0,2 (n = 7)	380/375nm: 0,9 (n = 1)
ε pro nativer Chromophor (errechnet aus der Denaturierung)	665nm: 109000 ± 6000 (l/Mxcm)	380nm: 36000 (l/Mxcm)
$E_{nativ}/E_{Chromopeptid\ (Kation)}$	665/665nm: 3,7±0,2 (n = 5)	nicht bestimmt[c]
ε pro nativer Chromophor (errechnet aus der Proteolyse	665nm: 118000 ± 6000 (l/Mxcm)	-

Stoker et al./1978b), was die von Correll et al./1968c vorgeschlagene Doppelhantel-Form von hochmolekularem Phytochrom weiter spezifizieren würde. Andere Untersuchungen an ^{125}J-markierten tryptischen Peptiden von Kidd et al./1978 mit autoradiographischen Methoden zeigten jedoch deutliche Unterschiede zwischen hoch- und niedermolekularem Phytochrom. Worauf diese Diskrepanzen zurückgehen (z.B. verschiedene Methoden) und mithin in welchen physikalisch-chemischen und biochemischen Eigenschaften die unterschiedlich großen Phytochrom-Spezies einander wirklich entsprechen, bedarf noch weiterer Untersuchungen.
Wie in Kapitel IV) detailliert erläutert wird, beeinflußt die Art der photochemischen Behandlung der Probe nicht unerheblich die absolute Extinktion auch in der vergleichsweise stabilen P_r-Form. Eine exakte Bestimmung des Extinktionswertes müßte auf die maximal mögliche Extinktion des P_r-Maximums bezogen sein. Man darf sicherlich annehmen, daß in der Vergangenheit bei der Bestimmung des Extinktionskoeffizienten dies nicht hinreichend berücksichtigt war.
Vor der Messung wurden die hier verwendeten Proben sättigend mit DR-Licht bestrahlt, um den in der Laborpraxis nie ganz zu vermeidenden P_{fr}-Anteil rückzubelichten. Aus Gründen der Praktikabilität wurde stets das normale DR-Filter verwendet, das einen kleinen HR-Anteil besitzt. Mit einer Langzeitbelichtung mit einem Filter bei 760nm erzielt man im P_r-Maximum einen ca.5% höheren Wert. Wenn man dies für die hier gefundenen Werte berücksichtigt, erhöht sich der Mittelwert ε_{665} von 114000 auf den den Betrag von 120000.
Ein Extinktionskoeffizient von Phytochrom bei 665nm von 120000 und bei 380nm von 36000 bzw. von Phycocyanobiliproteid im Langwelligen um 100000 und im Kurzwelligen um 20000 im Unterschied zu Werten um 35000 für die freien Chromophore bestätigt bestens die anderweitigen Belege für eine stark gestreckte Konformation der nativen Chromophore (Burke et al./1972, Scheer und Kufer/1977, Bois-Choussy und Barbier/1978, Lehner et al./1978a, Lehner et al./1978b), denn nur aufgrund einer stark gestreckten Konformation ist eine solche Zunahme der Oszillatorstärken im Langwelligen denkbar.

1.2) Chromophorabspaltung. Strukturaufklärung

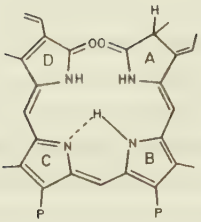
1.2.1) Stand der Forschung

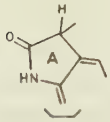
Wie in der Einleitung überblicksweise zusammengefaßt beruht das bisherige Wissen über Struktur und Bindung des P_r-Chromophors auf ausschließlich indirekten Daten. Alle Versuche den Chromophor selbst zu isolieren und zu charakterisieren scheiterten aus zwei Gründen, einmal an der geringen Ausbeute, zum anderen am Fehlen geeigneter Vergleichssubstanzen. Siegelman et al./1966 versuchten analog zu PC eine Abspaltung des Chromophors mit kochendem Methanol; die Ausbeute betrug aber weniger als 10%. Kroes/1970 wandte eine Methode an, die bei PC nahezu quantitative Ausbeuten geliefert hatte, die Behandlung mit HBr in TFA bei Raumtemperatur; wider Erwarten waren hier die Ergebnisse noch schlechter als bei Siegelman et al./1966. Alles, was aus diesen Experimenten über den Chromophor ausgesagt werden konnte, war, daß PCT im UV/vis-Spektrum und dünnschichtchromatographisch sich sehr ähnlich verhält wie PCB, jedoch nicht identisch mit PCB ist.
Deshalb wird in dieser Arbeit zunächst die Chromophorabspaltung verbessert und die Chemie der Abspaltung mit totalsynthetischem E-PCT und Z-PCT (Abb.15) studiert. Dies läßt dann im Vergleich mit dem freien Chromophor aus nativem Phytochrom eine eindeutige Identifizierung des Chromophors in der P_r-Form zu.

1.2.2) Abspaltungsreaktionen mit Modellsubstanzen

Die von Kroes/1970 für PC beschriebene Methode der Chromophorabspaltung mit HBr in TCA erwies sich auch hier als fast quantitativ: nach 10 minütiger Behandlung mit HBr ließ sich alles blau gefärbte Material mit organischer Lösung aufnehmen, während das farblose Protein in wässrige Phase ging. Das veresterte Produkt (Arbeitsgang s.Kapitel II) zeigte in der Dünnschichtanalyse neben dem bekannten E-PCB eine kleinere, schneller laufende Komponente, die mit folgenden Experimenten als Z-PCB (Abb.15) identifiziert wurde: 1) Die Produkte waren chromatographisch identisch mit totalsynthetischem E-PCB und Z-PCB.

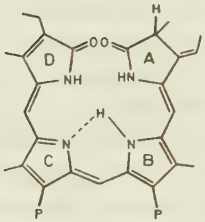
a)

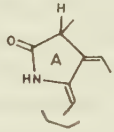




b) Ring B, C und D wie in a)

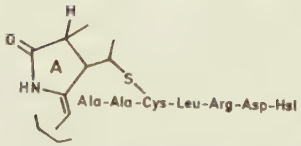
c)





d) Ring B, C und D wie in c)

e)



Ring B, C und D wie in c)

f)

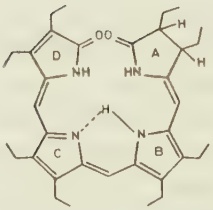


Abb.15) Schematische Strukturen von a) E-PCT, b) Z-PCT, c) E-PCB, d) Z-PCB, e) PC-Chromopeptid, f) DHBV; P = CH_2-CH_2-COOH für die freien Carbonsäuren bzw. P = CH_2-CH_2-$COOCH_3$ für die hier untersuchten veresterten Produkte.

2) Z-PCB, chromatographisch isoliert, ließ sich durch Säurebehandlung (H_2SO_4 oder HBr) in ein Gemisch aus E-PCB(Hauptprodukt und Z-PCB (Nebenprodukt) verwandeln. 3) Die umgekehrte Behandlung von E-PCB mit Säure führte zum gleichen Produktgemisch. 4) Isoliertes Z-PCB ließ sich photochemisch in E-PCB (Hauptprodukt) und Z-PCB (Nebenprodukt) umwandeln; ebenso E-PCB. - Bei der Abspaltung mit kochendem Methanol wurde dies Produktgemisch von Z-PCB neben E-PCB bislang nicht gefunden. Für Phytochrom ist im Unterschied zu PC eine Vinylgruppe an Ring D vorgeschlagen (s.Kapitel I); es liegt nahe, daß eine solche sehr reaktive chemische Gruppe für die unterschiedlichen Ausbeuten von PC und Phytochrom bei der Chromophorabspaltung verantwortlich ist. Da PE am Ring D des Chromophors eine Vinylgruppe besitzt und mit HBr in TFA schlechtere Ausbeuten an freiem Chromophor als PC zeigt, wurden Vorversuche mit PE zur Optimierung der Abspaltungsreaktion durchgeführt.
Um möglichst viele reaktive Gruppen des Proteins zu entfernen, wurden Chromopeptide hergestellt, die nun bei Behandlung mit HBr in TFA wesentlich bessere Ausbeuten bei der Chromophorabspaltung lieferten (zur Durchführung vgl.Kapitel II). Die dünnschichtchromatographische Analyse des so gewonnenen PEB auf HPTLC-Kieselgel-Platten (CCl_4 : Essigester, 1 : 1, v : v) zeigt zwei rote Banden mit R_F-Werten von 0,22 und 0,18, die einem Diastereomeren-Paar aufgrund der beiden chiralen Zentren an C_2 und C_{16} entsprechen (Scheer und Bubenzer, unveröff., vgl. Abb.16). Da biochemisch eine einheitliche Stereochemie zu erwarten ist, wurden die beiden Produkte dünnschichtchromatographisch getrennt und erneut einer Behandlung mit HBr in TFA unterworfen. Die Rechromatographie lieferte wiederum die beiden Produkte; dies bedeutet, daß im sauren Milieu vermutlich über Keto/Enol-Gleichgewichte - formulierbar sowohl für C_2 wie für C_{16} - eine Konfigurationsumkehr erfolgt.Dies Ergebnis wird bestätigt im Vergleich mit einem totalsynthetischen Diastereomeren-Paar von PEB, das sich identisch verhält. Eine besondere Reaktivität der Äthylidengruppe an Ring A wie bei PCB konnte nicht festgestellt werden; die bevorzugte Reaktivität im Sauren scheint hier das Keto/Enol-Gleichgewicht zu sein.

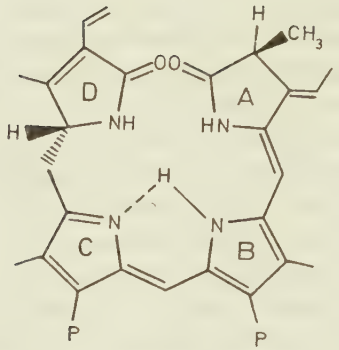


Abb.16) Schematische Struktur von PEB mit zwei Chiralitätszentren an C-2 und C-16;
P = CH_2-CH_2-$COOCH_3$.

Weiterhin geht aus den Vorversuchen mit PE und PC hervor, daß man hier mit Nebenraktionen rechnen muß. Aus diesem Grund wurde die Reaktion von HBr mit totalsynthetischem E-PCT (Abb.15) getestet. E-PCT lieferte nach dieser Behandlung in Methanol aufgenommen quantitativ ein chromatographisch neues blaues Produkt. Das neue Hauptprodukt wurde mit folgenden Experimenten als Methanoladdukt an die Vinylgruppe von Ring D identifiziert (Abb.17). Das Massenspektrum (Abb.18) zeigt einen Molekülpeak bei m/e = 644, der einer Anlagerung von einem Molekül Methanol an PCT (M = 612) entspricht. Das Fragmentierungsmuster zeigt die primäre Abspaltung von Methanol und die sukzessive Abspaltung der Proprionsäure-Seitenketten. Die Position des Methoxi-Substituenten ergibt sich aus dem ^{1}H-NMR-Spektrum (s. Tab.4). Fast alle Signale des Methanol-Addukts kann man auch in einem Phycocyanobilin-Peptid (Lagarias et al./1979) und in E-PCT finden, ausgenommen bei 1,427/1,444, 3,302/3,315 und 4,352/4,359 ppm. Diese Signale entsprechen einer $CH(OCH_3)CH_3$-Gruppe. (Die chemische Verschiebung stimmt jedoch nicht überein mit den Werten für das trans-figurierte Methanoladdukt von PCB wie sie Gossauer et al./1981 fanden. Da ferner für jeden Protonentyp zwei Gruppen von Signalen vorliegen, müssen die beiden möglichen Stereoisomeren nebeneinander vorliegen.) Mit HBr und

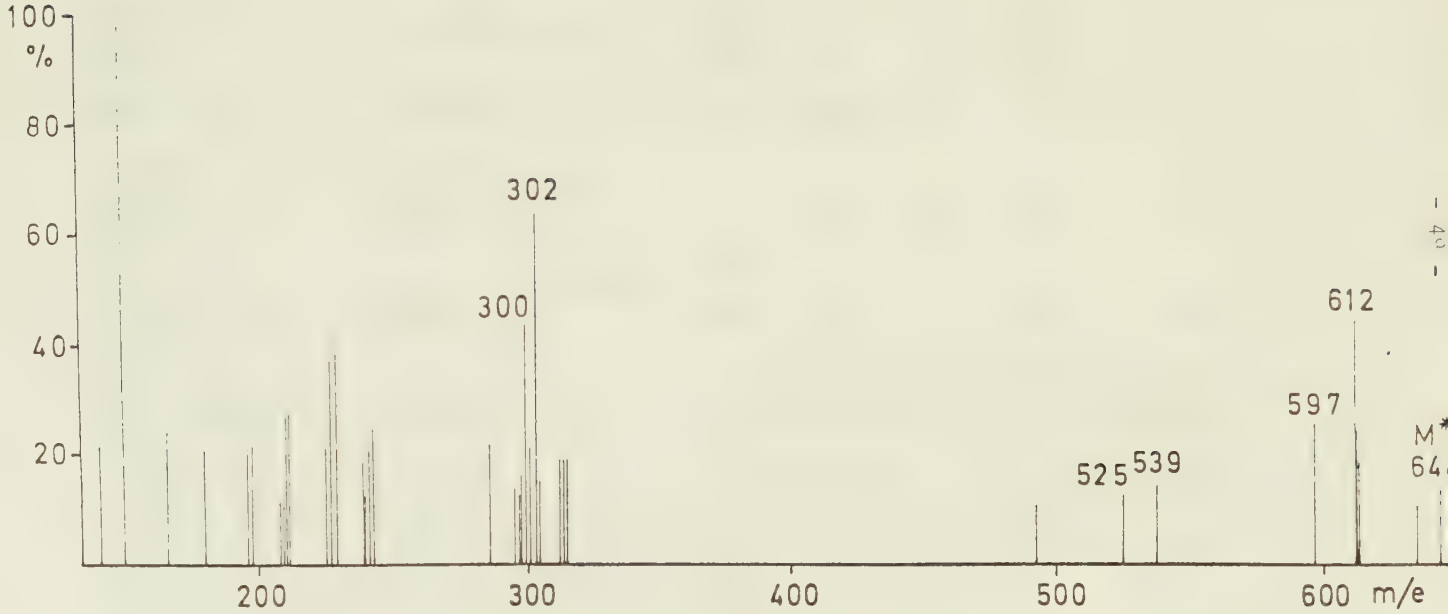


Abb.18) Umgezeichnetes Massenspektrum des Methanoladdukts an die Vinylgruppe von PCT(Abb.17a).

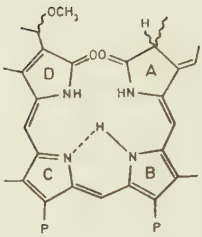
Tab.4) Zuordnung des 270-MHz ^{1}H-NMR Spektrums des Methanoladdukts an die Vinylgruppe von Ring D des E-PCT (Abb.17) in $CDCl_3$ verglichen mit den korrespondierenden Signalen von E-PCT und einem Chromopeptid von C-Phycocyanin (Abb.15);

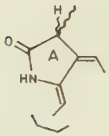
a) 100 MHz ^{1}H-NMR Daten nach Weller und Gossauer/1980;
b) 360 MHz ^{1}H-NMR Daten nach Lagarias et al./1979;
c) zwei Sätze von Signalen aufgrund eines Gemischs von Stereoisomeren;
d) enthält vermutlich auch ein Multiplett von 2-H;
e) Zuordnung zu 17-CH_3, da Stereoisomere an der C-18 Seitenkette bevorzugt zwei Signale an dieser Position verursachen sollten, aber nicht an 7-CH_3 und 13-CH_3;

Methanoladdukt an E-PCT($CDCl_3$)			E-PCT($CDCl_3$)a)		PC-Peptid (Pyridin-d_5)b)	
ppm	Multiplizität J (Hz)	Zuordnung	ppm	Multiplizität J (Hz)	ppm	Multiplizität J (Hz)
1.339c) / 1.359	d; 8	2-CH_3	1.30	d; 8	1.39	d; 7.3
1.427c) / 1.444	d; 7	18-$CH(OCH_3)CH_3$	-	-	-	-
1.905	d; 7	3-CH-CH_3	1.81	dd;8 und 1	-	-
2.046	s	7.13-CH_3	2.03	s	2.02	s
2.126	s		2.12	s	2.07	s
2.270c) / 2.274	s	17-CH_3e)	2.20	s	2.12	s
2.553d)	m	8.12-$CH_2CH_2CO_2R$	2.4-2.7	m	2.83; 2.85	m

3.302[c] / 3.315	s	18-$CH(OCH_3)CH_3$	-	-	-	-
2.270[c] / 2.274	s	17-CH_3[e]	2.20	s	2.12	s
2.553[d]	m	8.12-$CH_2CH_2CO_2R$	2.4-2.7	m	2.83; 2.85	m
2.86-2.98	m	8.12-$CH_2CH_2CO_2R$	2.8-3.2	m	3.09; 3.17	m
3.302[c] / 3.315	s	18-$CH(OCH_3)CH_3$	-	-	-	-
3.674	s	8,12 Propionsäure-ester OCH_3	3.68	s	-	-
3.685	s		3.70	s	-	-
4.352[c] / 4.359	m	18-$CH(OCH_3)CH_3$	-	-	-	-
5.830	s	5-H	5.82	s	5.87	s
6.065	s	15-H	6.08	s	6.08	s
6.407	dq; 7 und 2	3- $CH-CH_3$	6.38	dq 7 und 2.2	-	-
6.627	s	10-H	6.63	s	7.29	s

a)





b) Ring B, C und D wie in a)

Abb.17) Schematische Struktur des a) E- und b) Z-konfigurierten Methanoladdukts an die Vinylgruppe von PCT; P = CH_2-CH_2-$COOCH_3$.

Methanol wurde kein Methanol-Addukt von PC oder PCB erhalten. Ferner zeigt das Methanol-Addukt von PCT noch die Äthylidengruppe an Ring A im ^{1}H-NMR-Spektrum: die Signale bei 1,905 und 6,407 ppm sind typisch für die E-Konfiguration und deutlich verschieden von 2,12 und 5,86 ppm für Z-PCT oder 2,08 und 5,84 ppm für Z-PCB (Weller und Gossauer/1980). Dafür fehlen erwartungsgemäß die Signale der Vinylgruppe bei 5,41, 6,22 und 6,52 ppm (Weller und Gossauer/1980), die in dieser Tabelle nicht aufgeführt sind.

Wenn man die Reaktion mit HBr und Methanol auf Z-PCT (Abb.15) anwendet, erhält man nach DC-Analyse ein Gemisch aus zwei neuen Produkten, dem Methanol-Addukt an E-PCT und E-PCT (R_F-Werte s. Tab.5). Z-PCT wird dabei vollständig umgesetzt. Das aus dieser Reaktion hervorgegangene E-PCT läßt sich durch neue Behandlung mit HBr und Methanol vollständig zum Methanol-Addukt umsetzen. Das bedeutet, daß dieses E-PCT bei der Einleitung von HBr nicht zugegen war, sondern vermutlich erst bei der späteren Überführung in Methanol entstanden ist. Um sicher zu gehen, daß es sich bei der DC-Analyse um das Methanol-Addukt an E-PCT handelt und nicht etwa um das Methanol-Addukt an Z-PCT, wurde mit dem Methanol-Addukt an E-PCT eine Photoisomerisation durchgeführt. Das so entstandene Gemisch enthielt außer Spuren von Z-PCT und E-PCT ein 1 : 1 Gemisch aus dem Methanol-Addukt an E-PCT und einem neuen, etwas schneller laufenden Produkt, das das Methanol-Addukt an Z-PCT sein mußte (R_F-Werte s. Tab.5).

Tab.5) R_F-Werte von Bilipigmenten, die als Vergleichssubstanzen für die Chromophorabspaltung von Phytochrom dienen. DC auf Kieselgel G HPTLC-Platten (Merck).

	CCl_4/Essigester (1 : 1, v : v)	CCl_4/Eisessig (1 : 1, v : v)
E-PCT	0,40	0,41
Z-PCT	0,45	0,48
E-PCB	0,35	0,37
Z-PCB	0,41	0,43
Methanol-Addukt an E-PCT	0,27	0,35
Methanol-Addukt an Z-PCT	0,33	0,43

Gemäß den vorliegenden experimentellen Befunden läßt sich das in Abb.19) dargestellte Reaktionsschema wahrscheinlich machen: HBr lagert sich nicht nur an die Vinylgruppe an und bildet ein Bromaddukt, sondern auch an die Äthylidengruppe. Die weitere Reaktion mit Methanol führt dann entweder zur Eliminierung von HBr an der Seitenkette von Ring A zum E-PCT oder zur nucleophilen Substitution zum Methanol-Addukt an Ring D. Dieses Reaktionsschema verlangt gegenüber HBr eine Reaktivität in der Reihenfolge Z-Äthyliden > Vinyl > E-Äthyliden sowie den Ausschluß einer zweiten Anlagerung von HBr an Ring D, wenn eine solche bereits an Ring A erfolgt ist und umgekehrt. Weitere experimentelle Überprüfung dieser Reaktivität ist hier noch nötig. Bemerkenswert ist jedenfalls die besonders ausgeprägte Reaktivität der Vinylgruppe von PCT, was vermutlich darauf zurückgeht, daß diese Vinylgruppe mit dem konjugierten System des Chromophors verbunden ist.

1.2.3) Ergebnisse mit Phytochrom

Aus den Vorversuchen geht hervor, daß sich auch für Phytochrom die Verwendung von Chromopeptiden für die Abspaltungsreaktion empfiehlt; dazu wurden peptische Chromopeptide von P_r hergestellt (Arbeitsgang s. Kapitel II). Die gereinigten und lyophilisierten Chromopeptide wurden in TFA mit HBr behandelt. Dabei wurde die blaue Lösung zwischenzeitlich gelbgrün, vermutlich durch eine intermediäre Protonierung an der

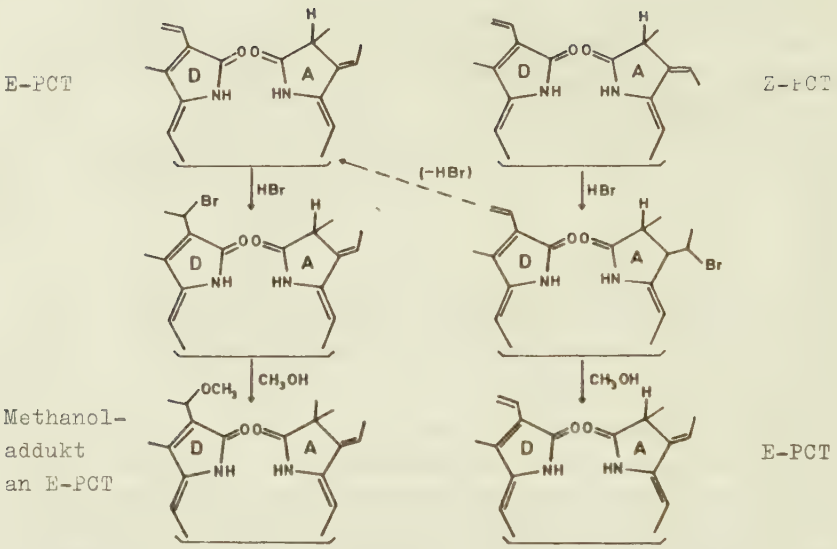


Abb.19) Vorgeschlagenes Reaktionsschema von E-PCT und Z-PCT mit HBr und Methanol.

Methinbrücke zwischen Ring B und C. Nach der Chromophorabspaltung wurde in Methanol aufgenommen, wobei die Lösung wieder blau wurde. Die DC-Analyse - nach Veresterung - zeigte zwei blaue Produkte, E-PCT und das Methanoladdukt an E-PCT im Verhältnis von ca. 1 : 1. Die Gesamtausbeute an verestertem Produkt betrug 25%. Damit ist zum ersten Mal der Phytochrom-Chromophor in definierter Form isoliert und in seiner für P_r vorgeschlagenen Struktur bestätigt worden.
Mit einer weiteren unabhängigen analytischen Methode wurde dieses Ergebnis nochmals erhärtet. Gallenfarbstoffe können durch die Lage ihrer langwelligen Maxima charakterisiert werden (Rüdiger/1971). Neutrale Bilatriene zeigen breite Banden mit Schultern oder zwei Peaks unterschiedlicher Intensität (Weller und Gossauer/1980, Rüdiger/1971, Klein und Rüdiger/1979). Um diese Spektren aufzulösen in scharf charakterisierte Maxima wurde hier die Methode der zweiten Ableitung angewandt (Tab.6). Da das konjugierte System des Methanol-Addukts an E-PCT und von PCB gleich ist, ist auch die Lage der Maxima fast identisch. Der Verlust der Äthylidengruppe führt zu einer hypsochromen Verschiebung von ungefähr 20nm(DHBV/Abb.15),während die

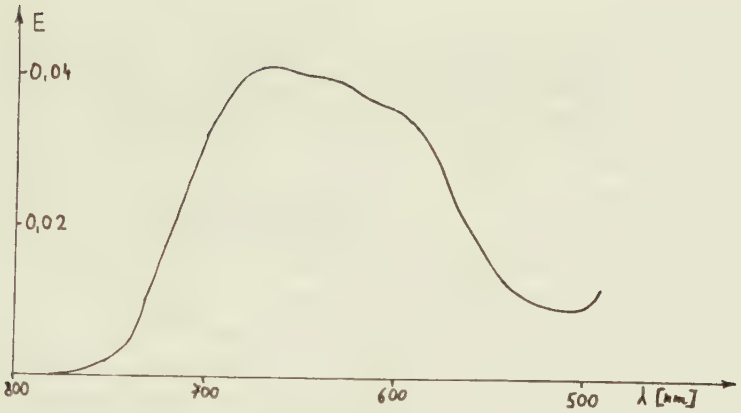


Abb.20) Absorptionsspektrum des Produktgemischs aus der Chromophorabspaltung von Phytochrom (E-PCT und das Methanoladdukt an die Vinylgruppe von Ring D des E-PCT) in Essigester.

Einführung einer Vinylgruppe zu einer bathochromen Verschiebung von 15 - 20nm führt (PCT). Das Produktgemisch aus der Chromophorabspaltung von Phytochrom (Abb.20) zeigt in der zweiten Ableitung 2 Peaks bei 582 und 603nm und eine breite Bande bei 639 - 649nm, die sicherlich zwei weitere Peaks enthält. Nachdem vorher getestet wurde, daß sich aus definierten Pigmentgemischen das Spektrum einer Komponente nach Subtraktion der anderen erhalten läßt (durchgeführt mit den zweiten Ableitungen), wurde dies Verfahren auch auf Phytochrom angewandt. Da die DC-Analyse ein Produktverhältnis von ca. 1 : 1 erbrachte, wurde das Methanol-Addukt vom nativen Gemisch auf der Basis eines 1 : 1 -Gemischs subtrahiert. Das Differenzspektrum, das sich dabei ergibt (603nm und 651nm) stimmt sehr gut mit dem Spektrum von PCT überein (600nm und 653nm), so daß auch aufgrund dieser rechnerischen Spekralanalyse die Produktzusammensetzung aus PCT und dem Methanol-Addukt an PCT bestätigt ist. Die Ergebnisse mit Phytochrom lassen sich dahingehend erklären, daß die Thioätherbindung nicht stereospezifisch gespalten wird und Z-PCT und E-PCT liefert (ähnlich wie bei PC). E-PCT bildet dann mit HBr und Methanol das Methanol-Addukt an E-PCT, während Z-PCT sowohl E-PCT wie auch das Methanol-Addukt an E-PCT ausbildet (s.Abb.19). Deshalb erhält man das Produktgemisch aus ausschließlich E-PCT und dem Methanol-Addukt an E-PCT.

Tab.6) Spektraldaten von PCT und verwandten Pigmenten in Essigester. Bestimmung der Maxima aufgrund der zweiten Ableitung; a) Differenzspektrum = Spektrum des Pigmentgemischs von Phytochrom minus Spektrum des Methanol-Addukts an PCT, berechnet auf Basis eines 1 : 1 -Gemischs gemäß DC-Analyse.

Pigment	Absorptionsmaxima (nm)	
DHBV (Abb.15f)	617	566
E-PCB	641	587
Methanol-Addukt an E-PCT	636	582
E-PCT	653	600
Pigmentgemisch von Phytochrom	639 - 649	603, 582
Differenzspektrum[a)]	651	603

1.3) CD-Messungen

1.3.1) Stand der Forschung

Aufgrund seiner drei chiralen Zentren an C2, C3 und C3[1] sollte der Phytochrom-Chromophor eine ausgeprägte optische Aktivität besitzen; hinzu kommt noch der Einfluß des kovalent gebundenen Proteins. CD-Messungen an Phytochrom wurden schon von verschiedenen Autoren vorgenommen (Kroes/1968, Hopkins und Butler/1969, Anderson et al./1970, Burke et al./1972, Tobin und Briggs/1973, Song et al./1979). Über den qualitativen Verlauf der CD-Spektren besteht weitgehende Übereinstimmung. Lediglich im UV-Bereich bei ca. 230nm fanden Hopkins und Butler/1969 einen kleinen Unterschied zwischen P_r und P_{fr}, den Tobin und Briggs/1973 nicht reproduzieren können. Song et al. finden, daß bei qualitativ gleichem Verlauf die Elliptizität von hochmolekularem Phytochrom etwas größer ist als die von niedermolekularem. Da bei einem genauen Vergleich die jeweilige Konzentration an Phytochrom über die Formel

$$I \Delta \varepsilon I = \frac{mm \times F}{d \times c} = \frac{\text{Skalenausschlag(mm) x Verstärkungsfaktor}}{\text{Schichtdicke(mm) x Konzentration}}$$

als relativ unsichere Größe mit eingeht, kann dieser geringfügige Unterschied nicht unbedingt als signifikant betrachtet werden. Zudem fehlen bei dieser Arbeit wie bei allen vorhergehenden Angaben der absoluten Größen $\Delta\varepsilon$ und ϑ. Dies wird in der vorliegenden Arbeit nachgeholt, wobei sowohl hoch- als auch niedermolekulares Phytochrom (bei vollständiger qualitativer Übereinstimmung) gemessen wurde; zur quantitativen Auswertung wurde nur niedermolekulares Phytochrom herangezogen, da hier sehr konzentrierte Lösungen hergestellt werden konnten. Dadurch war es auch möglich die Feinstruktur des Spektrums im Sichtbaren aufzuklären. Die Berechnung der Elliptizität wurde mit den Extinktionskoeffizienten nach Tobin und Briggs/1973 durchgeführt; für größere Extinktionskoeffizienten ergeben sich sinngemäß kleinere Konzentrationen und gemäß obiger Formel größere Werte für die Elliptizität.
Zum Vergleich mit dem nativen P_r-Chromophor wird in dieser Arbeit auch denaturiertes P_r und P_r-Chromopeptid herangezogen, um den Einfluß von Chromophor und Protein auf das CD-Spektrum zu trennen. Als weitere Vergleichssubstanz dient auch hier wieder PC, das sowohl nativ als auch denaturiert und als Peptid bereits gemessen wurde (z.B. Glazer et al./1973, Lagarias et al./1979, Rigbi et al./1980, Jung et al./1980, Scheer und Lehner in prep.).

1.3.2) CD-Messungen an P_r, denaturiertem P_r und P_r-Peptid

Abb.21) zeigt die CD-Spektren von nativem und denaturiertem P_r. Im Unterschied zu früheren CD-Spektren von P_r zeigt sowohl die positive Bande bei 370nm wie auch die negativen Banden bei 660 und 290nm eine Feinstruktur. Im Chromophorbereich ließe sich dies durch eine inhomogene Konformation ebenso wie durch verschiedene Übergänge erklären. Der Vorzeichenwechsel von 660nm nach 370nm und die beachtliche Größe der Elliptizität legen eine inhärent chirale Konformation nahe. Bei der Denaturierung mit Harnstoff zum P_r-Kation verändert sich das CD-Spektrum grundlegend. Es treten zwei neue Banden, eine positive bei 670nm und eine negative bei 375nm auf, die keinerlei Feinstruktur mehr zeigen. Die Abnahme in der Größenordnung läßt auf eine weniger gespannte, da vom Protein unbeeinflußte Konformation schließen. Die zweifache Vor-

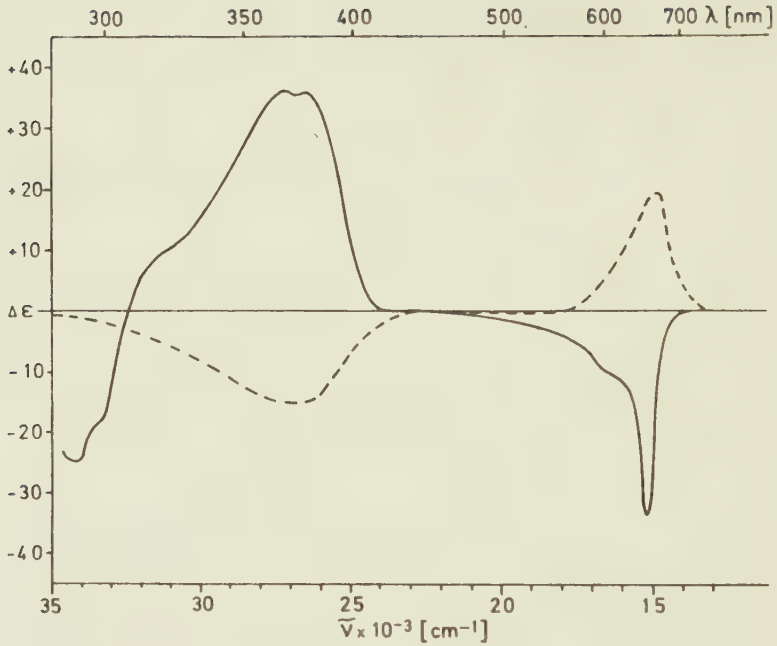


Abb.21) CD-Spektrum von niedermolekularem Phytochrom in der P_r-Form (c = 5 µM/4°C);
gerade Linie: in Puffer/pH 7,4 (nativ);
gestrichelt: in 8M Harnstoff/pH 2,5 (denaturiert).

zeichenänderung könnte, oberflächlich betrachtet, auf Enantiomere schließen lassen, aber da der Gesamtverlauf keinen Spiegelbildcharakter zeigt, lassen die Daten nur dissymetrische Verhältnisse zu, wobei speziell der induktive Einfluß des Proteins noch zu berücksichtigen ist. Jedenfalls ist der Chromophor im nativen und denaturierten Zustand verschieden konformiert.

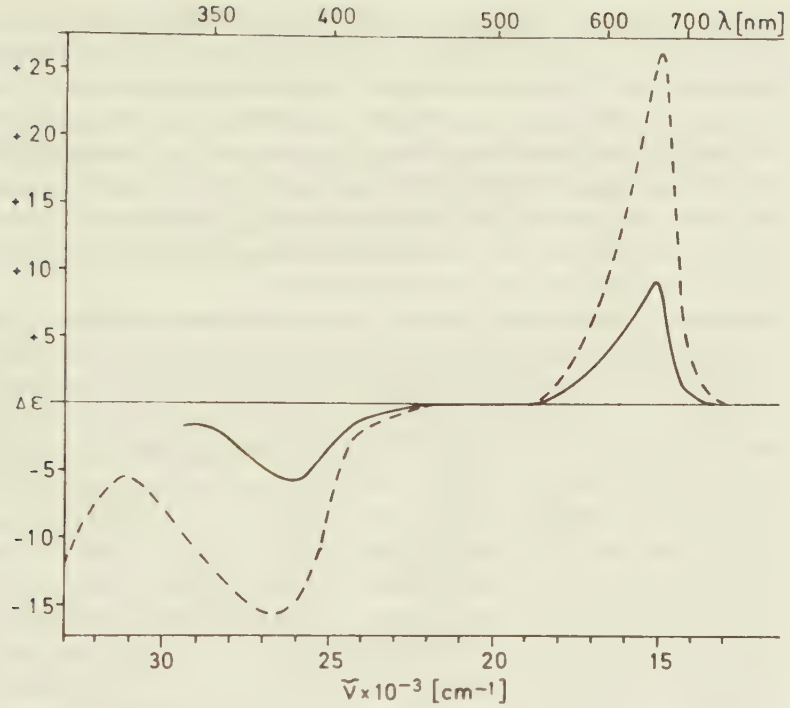


Abb.22) CD-Spektrum des P_r-Chromopeptids (c = 2,5 μM/15°C); gerade Linie: in 30%iger Essigsäure ("nativ"); gestrichelt: in 7M Harnstoff/pH 2,5 ("denaturiert").

Abb.22) zeigt das CD-Spektrum des P_r-Chromopeptids (Kation). Die Übereinstimmung mit dem P_r-Kation ist sehr gut (abgesehen vom nahen UV, wo hier der spezifische Einfluß der Aminosäuren des Undekapeptids sich bemerkbar macht). Die Kongruenz der beiden unterschiedlich hergestellten Produkte belegt, daß der Chromophor bei diesen Operationen intakt bleibt. Die Elliptizität insgesamt ist aber geringer als beim P_r-Kation. Wenn man aber wie beim P_r-Kation Harnstoff zusetzt, steigt die Elliptizität auf denselben Wert an. D.h., daß die verbleibenden Amino-

säuren noch ausreichen, um einen Rest des gegensinnig wirkenden Einflusses des Proteins auf die Elliptizität zu bewahren. Ramachandran-Rechnungen zeigten, daß ein umfangreicher Substituent an $C3^1$ eine ausgeprägte Assymetrie in allen Bilin-Konformationen induziert (Scheer et al./1979). Weiterhin ist der Zustand des nativen Chromophors, der nach Lagarias und Rapoport/1980 protoniert vorliegen soll, grundlegend verschieden vom Zustand des kationischen Chromophors (sowohl im denaturierenden Milieu wie im Chromopeptid).
Interessant im UV-Bereich des P_r-Chromopeptids ist noch die negative Bande bei 230 bis 234nm (s.Tab.7). Da die Präparation in diesem Bereich nicht vollständig rein war, ist zwar der absolute Wert mit Vorsicht zu diskutieren, aber er ist jedenfalls sehr groß und viel zu groß, um als UV-Anteil des Chromophors in Frage zu kommen. Von den L-Aminosäuren des Undekapeptids (nach Fry und Mumford/1971) stehen hierbei zwei zur Diskussion, Tyrosin und Histidin, wobei letzteres im Peptid zweimal vertreten ist. Da Tyrosin nahe 280nm absorbiert, dürfte es mit der kleinen Schulter identisch sein, die im Absorptionsspektrum bei 290nm auftritt, während Histidin nahe 210nm absorbiert und somit in vergleichbarer Nähe zur negativen Bande im CD-Spektrum bei 230nm steht. Die außerordentliche Größe dieser Elliptizität, die aber mit Harnstoff stark reduziert wird, läßt auf eine Kopplung mit dem Chromophor schließen. In der Tat wäre Histidin eine Aminosäure, die bei der Phototransformation gut geeignet wäre zwischen Ring A und B zu koppeln. Vorallem aber, und gerade in Hinblick auf die beobachtete Wirkung von Harnstoff auf den Chromophor, liegt eine determinierende Funktion von Histidinresten für die Konformation nahe.
CD-Spektren von nativem PC zeigen sehr unterschiedliche Elliptizität. So zeigt z.B. Spirulina platensis im Roten eine positive, im Blauen eine negative Bande; beim Denaturieren bleiben die Verhältnisse gleich und entsprechen somit direkt dem denaturierten Phytochrom (Scheer und Lehner in prep.). Weiterhin haben PC und Phytochrom die gleiche relative Konfiguration der drei Chiralitätszentren, nämlich RRR oder SSS (Klein und Rüdiger/1978).[1)] Da die freien Chromophor Kationen von Spirulina

platensis und Phytochrom aber im CD-Spektrum gleichen Bandenverlauf zeigen, haben sie mithin dieselbe absolute Konfiguration und weitestgehend auch Konformation. Bei einer anderen Spezies (Synechococcus sp.) wurden Peptide mit einer negativen Bande im Roten und einer positiven Bande im Blauen gefunden (Lagarias et al./1979). Ob hier Unterschiede experimenteller Art (z.B. mit/ohne Harnstoff) und/oder in der Spezies vorliegen, müßte noch geklärt werden.

Tab.7) CD-Spektren des P_r-Chromophors in nativem und denaturiertem Zustand; a)nicht exakt bestimmt wegen Verunreinigungen

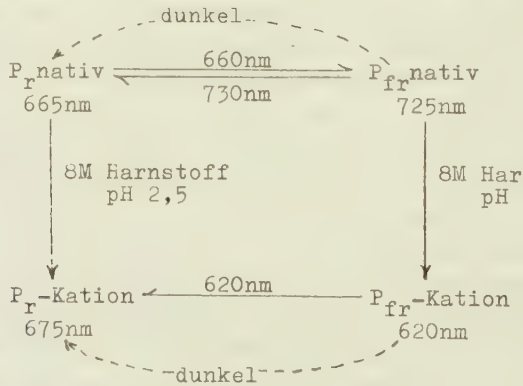
Probe	λmax (nm)	$\tilde{\nu}$max (cm^{-1})	$\Delta\varepsilon$max ($l \cdot M^{-1} cm^{-1}$)	Δmax x 10^{-3}
$P_r$nativ in	660	15152	-33,5	-110,5
10mM Tris-Cl/pH 7,4	615	16260	-10,3	- 34,0
	377	26525	+35,9	+118,5
	365	27397	+35,9	+118,5
	300	33333	-18,5	- 61,1
	292	34247	-25,0	- 82,5
$P_r$denaturiert in	670	14925	+19,4	+ 64,6
8M Harnstoff/pH 2,5	375	26667	-14,6	- 48,2
P_r-Chromopeptid in	660	15152	+ 9,3	+ 30,7
30%iger Essigsäure	385	25974	- 5,8	- 19,1
	230	43478	(-780)[a]	(-2574)[a]
P_r-Chromopeptid	665	15038	+26,4	+ 87,1
denaturiert in	373	26810	-15,8	- 52,1
7M Harnstoff/pH 2,5	234	42735	(-274)[a]	(-904)[a]

1) Bei Brockmann und Knobloch/1973, Fußnote 22, wird auf ein unveröffentlichtes Ergebnis von Brockmann et al. verwiesen, wonach für PC die absolute Konfiguration RRR lauten müßte.

2) Der P_{fr}-Chromophor

2.1) Stand der Forschung

Da P_{fr} längerwellig absorbiert als P_r haben sich die meisten bisherigen Modelluntersuchungen mit dem Problem befaßt, wie ein bei 660nm absorbierender Chromophor um ca. 50nm bathochrom verschoben werden kann durch Faktoren wie Ladung, Konformation und Länge des konjugierten Systems (z.B. Crespi et al./1967, Chae und Song/1975, Falk et al./1977, Falk et al./1978, Falk und Höllbacher/1978). In der Tat handelt es sich hierbei aber um ein Scheinproblem. Die Befunde von Grombein et al./1975 brachten hier durch den Vergleich von nativem und denaturiertem Phytochrom in der P_r- und der P_{fr}-Form etwas Licht in die wahren chemischen Verhältnisse. Wie im Schema 1) zusammengefaßt, besitzt der P_{fr}-Chromophor, wenn man ihn vom Einfluß des Proteins befreit, ein verkürztes konjugiertes System(aus Ring B, C und D, wie von Grombein et al./1975 vorgeschlagen). Dieses P_{fr}-Kation läßt sich durch Licht bei 620nm irreversibel in das P_r-Kation umwandeln. Im Dunkeln erfolgt diese Umwandlung ebenfalls in ca. 48h, d.h. nicht nur P_r ist thermodynamisch stabiler als P_{fr}, auch der P_r-Chromophor ist stabiler als der P_{fr}-Chromophor.



Schema 1) Licht- und Dunkelreaktionen von Phytochrom im nativen und denaturierten Zustand

Das Problem ist somit in zwei Schritte zerlegt, a) wie wird aus einem bei 660nm absobierenden Chromophor eine bei 620nm absorbierende Spezies und b) wie bewirkt das Protein, daß eine bei 620nm absorbierende Spezies nach 730nm verschoben wird. Zum ersteren Teilproblem liegen inzwischen einige Untersuchungen vor, die sich mit der Methinbrücke zwischen Ring A und B befassen, einmal durch Oxidation (Scheer und Krauss/1977, Scheer et al./1977, Krauss et al./1979) zum anderen durch Isomerisierung an der Methinbrücke (Falk et al./1980). Für theoretische Rechnungen mit semiempirischen Parametern (Ramachandran, PPP, CNDO) ergab sich stets eine stark gespannte Konformation des P_{fr} mit einer um ca. 90° gegeneinander verdrillten Ebene von Ring A und B, sowie syn E und syn Z zwischen Ring B, C und Ring C, D (Sugimoto et al./1976, Pasternak und Wagnière/1979, Scheer et al./1979).
In dieser Arbeit ging es darum durch genauere CD-Messungen an P_{fr} im Vergleich mit denaturiertem P_{fr} weitere Information über das Verhältnis Protein/Chromophor zu erhalten, sowie um den Versuch analog zum denaturierten P_{fr} ein P_{fr}-Chromopeptid herzustellen und zu charakterisieren.

2.2) Herstellung und Charakterisierung eines P_{fr}-Chromopeptids

In der Literatur (Fry und Mumford/1971) ist beschrieben, daß sowohl von P_r wie von P_{fr} ausgehend das gleiche Peptid erhalten wird. Hier wurde versucht unter Bedingungen, unter denen sich denaturiertes P_{fr} als relativ stabil erwies auch ein P_{fr}-Chromopeptid zu erhalten, nämlich im Sauren (pH < 3,0) unter völligem Ausschluß von Licht (möglichst auch Sicherheitslicht, das immer noch einen Rest von orangerotem Lichtanteil besitzt) und in Thunbergküvetten in N_2-Atmosphäre. Dazu wurde die vorher 24h gegen 10mM Tris-Cl/pH 7,4, 10mM KCl, 1mM EDTA, 1mM NaN_3 dialysierte Probe mit 1mg Pepsin/10mg Protein versetzt und saturierend mit HR-Licht bestrahlt. Sofort danach wurde konz. Ameisensäure aus dem Kipper der Thunbergküvette zugesetzt zu einer Endkonzentration von 5% Ameisensäure. Dann wurde 2h bei 37°C inkubiert. Das so entstandene P_{fr}-Peptid unterscheidet sich deutlich vom analog hergestellten P_r-Peptid; es hat ein Maximum bei ca.610nm und läßt sich mit Weißlicht oder Licht

bei 600nm innerhalb weniger Sekunden in das entsprechende P_r-Peptid bei 660nm umwandeln. Es verhält sich also ganz wie das P_{fr}-Kation. Ebenso wie dieses wandelt es sich auch binnen ca. 48h im Dunkeln bei 4°C in das P_r-Peptid um (bei höherer Temperatur schneller). Als nützlich zur Stabilisierung des Peptids erwies sich eine 50mM Konzentration an Ascorbinsäure; so kann beim Abbau z.B. auf die Thunbergküvette verzichtet werden. Eine vollständige Stabilisierung scheint jedoch nicht möglich; beim Frieren/Tauen oder Lyophilisieren eines P_{fr}-Peptids bleibt nur ein kleiner Teil als P_{fr}-Peptid erhalten. Bei höherem pH-Wert erfolgt zunehmende Umwandlung zum P_r-Peptid; die Grenze der Stabilität liegt bei pH 5 - 6. Eine weitgehende Stabilisierung über mehrere Wochen ist erfolgreich in saurer methanolischer Lösung bei -20°C.

Zwei wesentliche Probleme, um dieses P_{fr}-Peptid besser untersuchen und handhaben zu können, war die weitere Reinigung und die Konzentrierung. Prinzipiell müssen alle Arbeiten mit diesem Peptid möglichst rasch bei 4°C und mit möglichst wenig Einsatz von Sicherheitslicht von statten gehen. Als erster Schritt einer Reinigung erwies sich eine mit 0,1%iger Ameisensäure äquilibrierte P10 Biogel-Säule als optimal, da auf dieser Säule P_r-Peptid (das aufgrund des photostationären Gleichgewichts stets mit vorhanden ist) deutlich verschieden vom P_{fr}-Peptid läuft, das auf der Rückseite des Ausschlußpeaks von der Säule kommt (vgl. Kapitel II, Abb.14). Das P_r-Peptid ist offenbar nach Außen etwas kleiner und wird auf der Säule zurückgehalten; es läßt sich mit 30%iger Essigsäure von der Säule lösen. Um reines P_{fr}-Peptid zu erhalten, wird der Anteil des P_{fr}-Eluats, der nach dem Ausschlußpeak kommt, vereinigt und auf eine mit 0,1%ige Ameisensäure äquilibrierte Kieselgel 60-Säule (Korngröße 0,063 - 0,2mm) aufgetragen. Auf dieser Säule bleibt es als scharfe Zone hängen und läßt sich relativ konzentriert mit 30%iger Essigsäure ablösen. (Details und Standardverfahren s. Kapitel II, Punkt 5). Interessant ist, daß sich P_{fr}-Peptid auf der Kieselgel-Säule ebenfalls vom P_r-Peptid unterscheidet: Es läßt sich leichter ablösen als das P_r-Peptid, d.h. es scheint nach Außen eine geringere Oberflächenladung zu besitzen. In Anwesenheit von Spuren von Trichlor-

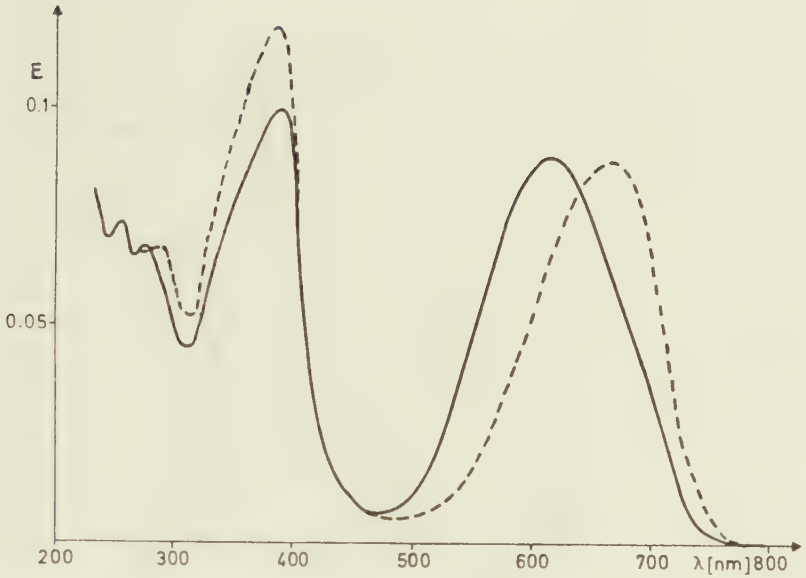


Abb.23) Gerade Linie: Absorptionsspektrum des P_{fr}-Chromopeptids in 30%iger Essigsäure; gestrichelt: Absorptionsspektrum nach 10sec. Belichtung bei 600nm = Absorptionsspektrum des P_r-Chromopeptids in 30%iger Essigsäure.

essigsaure läßt sich das P_{fr}-Peptid zur weiteren Konzentration in organische Lösungsmittel wie Butanol oder Methanol überführen mit Extinktionen bis zu 1. Reines P_{fr}-Peptid besitzt ein Maximum bei 600 bis 610nm (s.Abb.23).
Da das säulenchromatographische Verhalten von P_{fr}-Peptid gegenüber P_r-Peptid auf ein größeres Molekulargewicht schließen läßt, wurde eine Reihe von Experimenten unternommen, um festzustellen, ob bei der photochemischen Umwandlung des P_{fr}-Peptids ins P_r-Peptid eine Substanz (z.B.Aminosäure) festzustellen ist, die frei wird. Auf HPTLC Kieselgel-G Platten (Merck) liefen P_r- und P_{fr}-Peptid mit dem Laufmittel Essigsäure/H_2O/Butanol (1 : 1 : 2,4) völlig identisch; auch nach Belichten und zweidimensionaler Chromatographie waren keine Unterschiede festzustellen. Auch mit allen einschlägigen Verfahren (UV, Fluoreszenz, Ninnydrin, Chlor-Benzidin etc.) waren keine Unterschiede detektierbar. Um größere Mengen für die

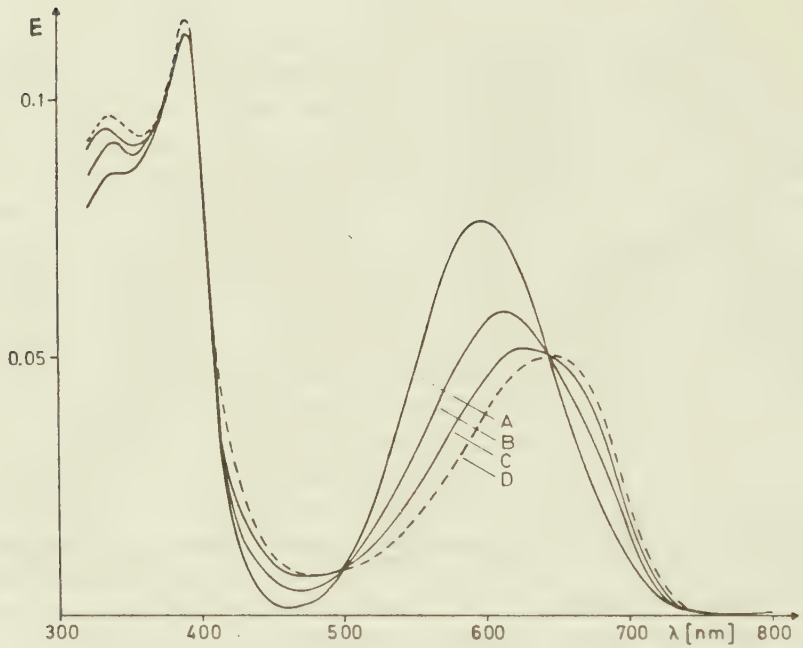


Abb.24) A) Absorptionsspektrum des P_{fr}-Chromopeptids in Methanol/o,1% Trichloressigsäure; B) direkt nach Zugabe von 0,1mM $Na_2S_2O_4$; C) direkt nach Zugabe von weiteren 0,1mM $Na_2S_2O_4$; D) nach anschließender Belichtung zum P_r-Chromopeptid.

Untersuchung zur Verfügung zu haben, wurde P_{fr}-Peptid aus einem Großansatz von ca. 50 Phytochrom-Einheiten hergestellt und nach Vorreinigung zu gleichen Teilen auf zwei Kieselgel-Säulen aufgetragen und gut gespült. Die eine der beiden Kieselgel-Säulen wurde dann belichtet, um das P_{fr}-Peptid in P_r-Peptid umzuwandeln. Dann wurden beide Säulen parallel gut gespült und die jeweiligen Eluate gefriergetrocknet. Die Lyophilisate wurden dünnschichtchromatographisch verglichen. Auch hier waren keine Unterschiede feststellbar. Damit scheint der auf den Chromatographiesäulen sichtbare Unterschied wohl auf eine unterschiedliche Stereochemie zurückzugehen. Dies könnte entweder eine Aminosäure des Peptids sein, die zwischen Ring A und B koppelt oder eine Isomerisierung, die die Doppelbindung zwischen Ring A und B so verschiebt, daß die Absorption ebenfalls

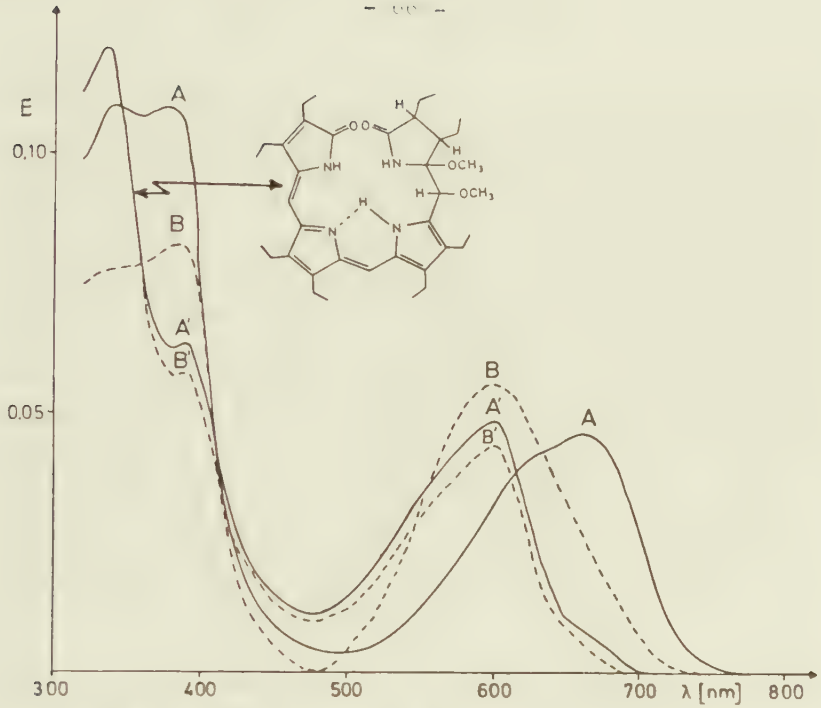


Abb.25) Wirkung katalytischer Mengen von J_2 auf Phytochrom-Chromopeptide (in Methanol/0,1% Trichloressigsäure).
A) P_r-Chromopeptid; A') P_r-Chromopeptid + J_2 (10:1/c:c);
B) P_{fr}-Chromopeptid; B') P_{fr}-Chromopeptid + J_2(10:1/c:c).
Das Insert zeigt die zu A') und B') gehörige Struktur von Dimethoxyviolin.

hypsochrom verschoben ist (z.B. eine Z/E-Isomerisierung oder eine Verschiebung der Doppelbindung in den Ring A). Um hier mehr in Erfahrung zu bringen, wurde die Reaktivität des P_{fr}-Peptids gegenüber Reduktions- und Oxidationsmitteln untersucht.

Mit Reduktionsmitteln (Na_2SO_3, $Na_2S_2O_4$) erhält man eine Umwandlung zum P_r-Peptid und je nach Konzentration mehr oder weniger stark eine irreversible Anlagerung von Reduktionsmittel zwischen Ring B und C zu einem bei 420nm absorbierenden Rubin-Chromophor; gleichzeitig bleicht die übrige Absorption aus. Mit $Na_2S_2O_4$ erhält man z.B. bei Konzentrationen < 0,2mM in erster Linie die chemische Revertierung zum P_r-Peptid (Abb.24). Dies ist eine Entsprechung zu der beschleunigten

Dunkelrelaxation von P_{fr} mit Reduktionsmitteln (s.Kapitel IV, Punkt 1.6). Mit Oxidationsmitteln wird das P_{fr}-Peptid sehr schnell zerstört. Wenn man Oxidationsmittel nur in katalytischen Mengen zusetzt (P_{fr}-Peptid : J_2 = 10 : 1) erhält man das typische Spektrum eines zwischen Ring A und B oxidierten Violins (Maxima: 600nm und 340nm) wie Abb.25) zeigt. Ein Parallelversuch mit DHBV unter gleichen Bedingungen lieferte die Anlagerung des Lösungsmittels Methanol zum Dimethoxiviolin, das durch Vergleich mit dem nach Krauss/1980 hergestellten Produkt identifiziert wurde. Um hier Effekte zu beobachten ist strikt anaerobes Arbeiten nötig. Bei anaerober Oxidation mit J_2 in katalytischen Mengen (fünffacher Überschuß an P_{fr}-Peptid) in organischer Lösung (Butanol) erfolgt ebenfalls eine Umwandlung zum P_r-Peptid. Als Hauptprodukt entstehen auch hier durch oxidative Anlagerung (vermutlich des Lösungsmittels) Violine, die bei 340 und 600nm absorbieren (vgl. Abb. 26).

Bei der Umwandlung von P_{fr}-Peptid in P_r-Peptid wird nicht nur die rote Bande langwellig verschoben, sondern die blaue Bande bei 380nm erhöht sich etwas, wobei die Schulter bei 340nm fast verschwindet; die UV-Bande wird von 280 nach 290nm verschoben. Ergänzende Untersuchungen am P_{fr}-Kation zeigten in Übereinstimmung mit dem P_r-Kation eine blaue Bande bei ca. 380nm.Falk et al./1980 konnten zeigen, daß ein Ätiobiliverdin der all-ZZZ-Form (650nm) gegenüber einem Biliverdin der EZZ-Form in Trichlormethan um 50nm bathochrom verschoben ist und bei 380nm stärker absorbiert als die EZZ-Form, die zudem bei 340nm eine Schulter hat. Für den allgemeinen Reaktionsverlauf skizziert er folgendes Schema:

Schema 2) Reaktivität von Bilatrienen nach Falk et al./1980; DH = nucleophile Donoren.

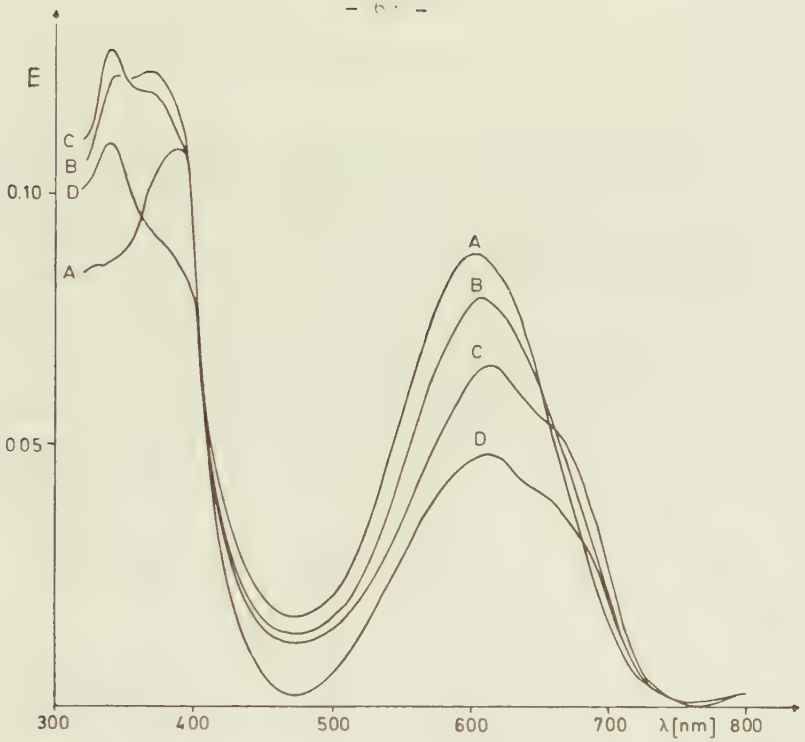


Abb.26) P_{fr}-Chromopeptid in Butanol/0,1% Trichloressigsäure unter anaeroben Bedingungen. A) Unter N_2-Atmosphäre (in einer Thunbergküvette); B) Nach Zugabe von J_2 (Peptid:J_2 = 5:1/c:c) aus dem Kipper der Thunberg-Küvette; C) 15min. nach Jodzugabe; D) 2h nach Jodzugabe;

Andererseits ist das Chromophorsystem eines Biliverdins nicht die ideale Vergleichssubstanz und zudem ist nach einer persönlichen Mitteilung von Prof.Dr.Falk dieses System nur in neutraler und basischer Lösung stabil. Insofern ist eine Isomerisierung, die reduktiv (oder auch anaerob oxidativ) katalysiert werden kann zwar ein naheliegendes Modell, aber andere Möglichkeiten sind deswegen nicht ausgeschlossen. Genaueres müßte ein ^{1}H-NMR-Spektrum des P_{fr}-Peptids erbringen.

2.3) CD-Messungen an P_{fr} und denaturiertem P_{fr}. Umrechnung des CD-Spektrums

Abb.27) zeigt die CD-Spektren von P_{fr} und vom P_{fr}-Kation. Der Vergleich mit Abb.21) zeigt, daß diese CD-Spektren mit den entsprechenden von P_r in manchen Bereichen große Ähnlichkeit besitzen. Aufgrund der Feinstruktur der CD-Spektren in dieser Arbeit und der ermittelten Absolutwerte ist es möglich den P_r-Anteil von 20% (aus dem photostationären Gleichgewicht) herauszurechnen. Zusätzlich wurde die Dunkelkinetik von P_{fr} rechnerisch berücksichtigt (vgl.Kapitel IV). Tab.8) faßt die Ergebnisse dieser Umrechnung zusammen. Wie man sieht, liegen bei P_{fr} bis auf eine positive Bande bei 710nm und eine negative Bande bei 370nm im Sichtbaren die CD-Werte unter Be-

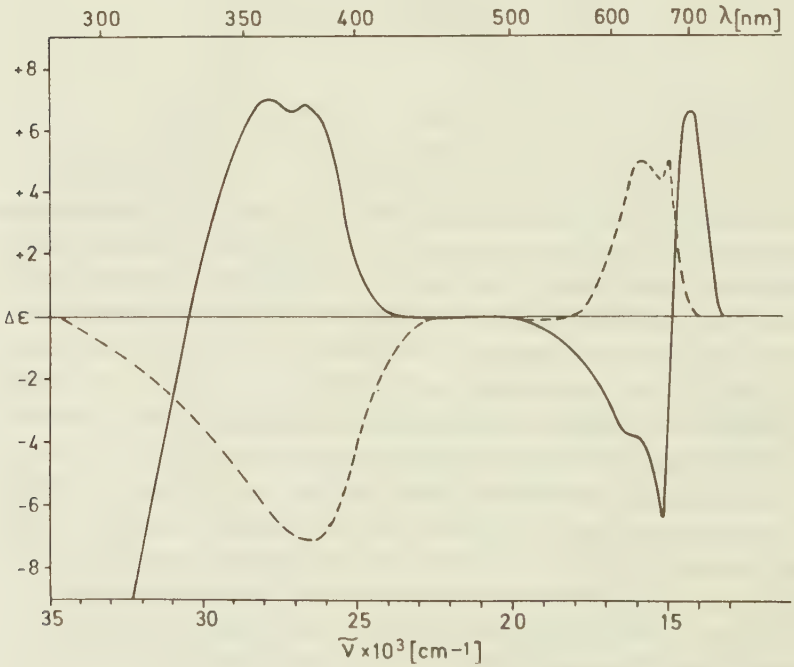


Abb.27) CD-Spektren von niedermolekularem Phytochrom in der P_{fr}-Form ohne Korrektur des P_r-Anteils (c = 5 µM/4°C). Gerade Linie: in Puffer/pH 7,4 (nativ); gestrichelt: in 8M Harnstoff/pH 2,5 (denaturiert).

Tab.8) CD-Spektren des P_{fr} in nativem und denaturiertem Zustand; 1) Korrektur auf Basis des Photogleichgewichts (Butler et al./1964) und der Dunkelrelaxation nach a) Pike und Briggs/1972 und b) kinetische Daten aus dieser Arbeit (s.Kapitel IV); 2) Korrektur auf Basis von überschlagsweise 25% P_r-Kation.

Korrekturformel: $(P_{fr} - \%P_r) \times \frac{100}{\%P_{fr}}$

Probe	λ max (nm)	$\tilde{\nu}$ max (cm^{-1})	$\Delta\varepsilon$ max ($l \cdot M^{-1} cm^{-1}$)	ϑ max x 10^{-3}
P_{fr}nativ	710	14085	+6,5	+21,5
(nicht korrigiert)	660	15152	-6,5	-21,5
in 10mM Tris-Cl/pH7,4	610	16393	-3,5	-11,6
	375	26667	+6,7	+22,1
	360	27778	+6,9	+22,8
	300	33333	-14,5	-47,9
P_{fr}nativ	710	14085	+8,2 a)	+27,1
(korrigiert) 1) in	660	15152	+1,3 a)	+ 4,3
10mM Tris-Cl/pH 7,4	615	16260	+0,5 a)	+ 1,7
	370	27027	-4,7 a)	-15,5
	300	33333	-12,7 a)	-41,9
	710	14085	+ 9,4 b)	+31,0
	660	15152	+ 2,9 b)	+ 9,6
	615	16260	+ 0,8 b)	+ 2,6
	370	27027	- 4,4 b)	-14,5
	300	33333	-14,9 b)	-49,2
P_{fr}denaturiert	675	14815	+5,0	+16,5
(nicht korrigiert)	625	16000	+4,75	+15,7
in 8M Harnstoff/pH2,5	380	26316	-7,2	-23,8
P_{fr}denaturiert	675	14815	+0,1	+ 0,3
(korrigiert) 2) in	625	16000	+3,6	+11,9
8M Harnstoff/pH 2,5	380	26316	-4,5	-14,9

rücksichtigung der experimentellen Genauigkeit nahezu bei Null. Gleichzeitig errechnet sich eine starke negative Bande bei 300 nm. Für das P_{fr}-Kation errechnet sich eine positive Bande bei 625nm und eine negative Bande bei 380nm. Insgesamt sind die Absolutwerte gegenüber P_r bzw. dem P_r-Kation deutlich niedriger, was auf eine stärkere Verdrillung des P_r-Chromophors schließen läßt in Übereinstimmung mit anderen experimentellen Befunden und theoretischen Berechnungen (Chae und Song/1975, Scheer und Kufer/1977). Die langwelligen CD-Banden von P_{fr} (710nm) und vom P_{fr}-Kation (625nm) korrespondieren mit den Absorptionsbanden bei 725 und 620nm. Die Verschiebung von 725 nach 710nm könnte durch verschiedene Übergänge mit einem Hauptmoment bei 710nm bedingt sein oder durch verschiedene Populationen von P_{fr}.

Da im Sichtbaren die Vorzeichen vom P_{fr} zum P_{fr}-Kation erhalten bleiben, während P_r gegenüber dem P_r-Kation die Vorzeichen wechselt und zudem die Vorzeichen bei P_{fr}, P_{fr}-Kation und P_r-Kation im Sichtbaren übereinstimmen, scheint die Konfiguration des P_{fr}-Chromophors dem denaturierten Zustand näher zu stehen als beim P_r. Oder anders formuliert: beim P_{fr} scheint das Protein den Chromophor in seiner Konformation wenig zu verändern. Bemerkenswert ist die positive Schulter von P_r bei 315nm, wo P_{fr} eine deutlich negative Elliptizität zeigt. Dies ist ein Bereich, in dem sich Wechselwirkungen zwischen Chromophor und Protein in einer spektralen Feinstruktur bemerkbar machen: Das UV-Differenzspektrum (P_r - P_{fr}) zeigt in diesem Bereich ein Minimum (Tobin und Briggs/1973). Dies ist ein weiterer Beleg dafür, daß die Chromophor-Protein-Wechselwirkung von P_r und P_{fr} sehr verschieden ist. Befreit vom Einfluß des Proteins zeigen P_r-Kation und P_{fr}-Kation eine positive rote und eine negative blaue Bande, was die einheitliche Determinierung der freien Chromophore durch die absolute Konfiguration der drei Chiralitätszentren zeigt.

Zusammengefaßt läßt sich sagen, daß das P_{fr}-Kation einen Chromophor repräsentiert, der den physiologischen Verhältnissen relativ nahe steht und durch eine relativ schwache Wechselwirkung mit dem Apoprotein zum P_{fr} wird, wobei die rote Bande stark bathochrom verlängert wird. Beim P_r dagegen wird durch das Apoprotein die Bandenlage wenig beeinflußt, deren Intensität aber durch eine stark verdrillende Wechselwirkung enorm erhöht; die physiologische Bedeutung dieser Eigenschaft liegt auf der Hand: P_r ist extrem lichtsensibel.

IV) CHROMOPHOR UND PROTEIN

1) Dunkelrelaxationen. Langlebige Intermediate

1.1) Stand der Forschung

1.1.1) Dunkelreversion. Meßprinzip

Phytochrom zeigt prinzipiell zwei verschiedene Dunkelphänomene, die Destruktion, den raschen physiologischen Abbau von Phytochrom nach HR-Licht, und die sog. Dunkelreversion, die in der Stoffbilanz die Bildung von P_r aus P_{fr} zeigt. Die eindeutige Unterscheidung zwischen den beiden Phänomenen, die anfangs häufig verwechselt wurden (z.B. Butler/1960), gelang Hillman/1964. Die Destruktion findet man stets in vivo - Ausnahme: Butler et al./1963 - die Dunkelreversion stets bei isoliertem Phytochrom. In vivo konnte die Dunkelreversion nur bei Dikotelydonen, nicht bei Monokotyledonen gefunden werden (Butler und Lane/1965,Furuya et al./1965); aber auch bei Dikotyledonen gibt es Ausnahmen (Kendrick und Frankland/1968). Generell gilt, soweit die Dunkelreversion in vivo überhaupt beobachtet wird, daß ihr Anteil im Vergleich zur Destruktion gering ist. Ob die in vivo beobachtete Dunkelreversion dieselbe ist wie die in vitro auftretende ist in der Tat fraglich und bedürfte noch eingehender Untersuchung. Diese Arbeit befaßt sich mit der Dunkelreversion nur in vitro. Die Literatur über in vitro-Versuche ist im einzelnen sehr kontrovers. Viele Messungen beschränken sich auf die Beobachtung der Extinktionszunahme bei 660nm als Index für die Bildung von P_r. Soweit die Extinktionsabnahme bei 730nm als Abnahme von P_{fr} mit der Extinktionszunahme bei 660nm als Bildung von P_r verglichen wird, finden einige Autoren hier im wesentlichen kinetische Übereinstimmung (Pike und Briggs/1972a, Mumford/1966), andere finden dies in keiner Weise (Correll et al./1968b, Taylor/1968). Einige Autoren finden nur eine kinetische Komponente (Anderson et al./1969, Mumford/1966) andere Autoren "at least two distinct stages"(Taylor/1968) oder"at least four species" (Correll et al./1968b). Negbi et al./1974 legen ihren kinetischen Daten zwei Komponenten zugrunde, räumen jedoch ein:"Another valid interpretation of the kinetics is that P_{fr} exists as molecules having an extremely broad distribution of first order rate constants

for dark reversion." Pike und Briggs/1972a und Mumford und Jenner/1971 finden eine Beschleunigung der Dunkelreversion in reduzierendem Medium, Manabe und Furuya/1971 im Basischen, Anderson et al., 1969 im Sauren; Pike und Briggs/1972 finden keine pH-Abhängigkeit. Correll et al./1968b finden eine Abhängigkeit von der NaCl-Konzentration; Pike und Briggs/1972a finden das nicht; weitere widersprüchliche Angaben über Ioneneffekte finden sich bei verschiedenen Autoren (Negbi et al./1974, Pratt und Cundiff/1975, Lisansky und Galston/1974). Pike und Briggs/1972a können nachweisen, daß hochmolekulares Phytochrom (MG = 240000) eine schnellere Kinetik zeigt als niedermolekulares Phytochrom (MG = 60000). Während allgemein bei tieferer Temperatur gefunden wird, daß die Dunkelreversion langsamer wird, finden Anderson et al./1969 hier teilweise eine Beschleunigung. Der Untersuchungszeitraum der einzelnen Autoren schwankt zwischen Minuten und Tagen. Die zugrundeliegende Pflanze und die Beschaffenheit der Lösung sind von Autor zu Autor verschieden. Die in Tabelle 9) zusammengestellte Übersicht über die vorliegenden Befunde zeigt, wie wenig die einzelnen Ergebnisse direkt verglichen werden können.
Ein Teil der widersprüchlichen Ergebnisse läßt sich von vornherein aufklären, wenn man die kinetischen Komponenten vergleicht, die die Autoren ihrer Auswertung zugrunde gelegt haben. Zum besseren Verständnis ist dieser Aspekt in Abb.28) zusammengestellt. So hat Mumford in seiner ersten Arbeit zu diesem Thema eine einzige kinetische Komponente unterstellt und diese aus zwei bis drei Meßpunkten am Ende der Kinetik errechnet; die gefundenen Geschwindigkeitskonstanten sind demzufolge durch die langsamste kinetische Komponente bestimmt und vergleichsweise klein. Ähnliches gilt für die Arbeit von Anderson et al./1969. Die beiden Arbeiten von Taylor/1968 und von Correll et al./1968b finden bei einer Untersuchung der Kinetik zu früheren Zeiten eine komplexe Kinetik; bei der Auswertung beschränken sie sich allerdings auf eine Unterteilung in die zwei bis drei langsamsten Komponenten, wobei sie folgerichtig bei früheren Komponenten deutlich schnellere Geschwindigkeitskonstanten als Mumford finden. Drei weitere Arbeiten (Manabe und Furuya/1971, Pike und Briggs/1972a, Negbi et al./1974) übernehmen im

Tab.3) Übersicht über vorliegende Untersuchungen zur Dunkelreversion in vitro (Meßbedingungen, Meßergebnisse und zugrundeliegendes Material)

Publikation	Pflanze	Molekulargewicht	Meßzeit	Lösung	Temp.(°C)	pH-Wert	Geschwindigkeitskonst.	Anmerkungen
Anderson et al./1969	Avena sativa (Hafer)	60000	2-48h	1:1:1, Glycerin: Glykol: KPP	12	7,6	$3,2 \times 10^{-6}$	kein Unterschied zwischen langsamer und schneller Komponente; Kinetik bei 730 und 665nm "im wesentlichen äquivalent";
					12	5,6	5×10^{-6}	
					9	7,6	$1,8 \times 10^{-6}$	
					9	5,6	$3,3 \times 10^{-6}$	
				KPP	10	5,9	$4,8 \times 10^{-6}$	
				Acetatpuffer	10	5,5	$1,5 \times 10^{-5}$	
Correll et al./1968b	Secale cereale (Roggen)	240000	17-90h	10mM KPP, 100mM ME, 20mM NaCl	25	7,8	660nm: $k_l=4,4x10^{-5}$ $k_s=1,2x10^{-4}$ 730nm: $k_l=-4,4x10^{-5}$ $k_s=-7,4x10^{-4}$	Kinetik bei 660 und 730nm verschieden; schnelle Komp. als Gemisch aus drei Phasen. (Das Vorzeichen der k-Werte bei 730nm wurde der Abnahme gemäß in 'minus' geändert)
				10mM KPP, 100mM ME, 500mM NaCl	25	7,8	660nm: $k_l=2,5x10^{-5}$ $k_s=7,1x10^{-5}$ 730nm:	

							$k_1=-4,1x10^{-5}$ $k_s=-6,9x10^{-4}$	
Kanabe und Furuya/1971	Pisum sativum (Erbse)	240000	1,5-5h	KPP	10	6,9 7,8	$2,0 \times 10^{-5}$ $3,9 \times 10^{-5}$	Die Autoren trennen zwar zwischen langs.und schneller Komp., geben aber keine k-werte an; die Werte hier sind aus der gegebenen Totaldifferenz(%) zurückgerechnet.
Mumford/ 1966	Avena sativa (Hafer)	60000	2-48h	10mM KPP, 50mM ME, N_2-Atm.	19 15 10 6	7,8 7,8 7,8 7,8	$1,1 \times 10^{-5}$ $4,9 \times 10^{-6}$ $2,9 \times 10^{-6}$ $1,2 \times 10^{-6}$	Kinetik bei 665 und 730nm"im wesentlichen äquivalent";kein Unterschied zwischen langs.und schneller Komp.
Mumford und Jenner/1971	Avena sativa (Hafer)	60000	10min. -24h	25mM KPP	10	7,8	$1,9 \times 10^{-6}$	Kein Unterschied zwischen langs. und schneller Komponente;
				25mM KPP 5mM $Na_2S_2O_4$	10	7,8	8×10^{-4}	
				25mM KPP 5mM NADH	10	7,8	$7,9 \times 10^{-6}$	
Negbi et al./1974	Secale cereale (Roggen)	240000	bis max. 10h	50mM KPP 100mM KCl	20	7,5	$k_1=2,5x10^{-5}$ $k_s=1,2x10^{-3}$	Die k-Werte sind auf log-Basis angegeben und sind hier auf ln-Basis umgerechnet.
				100mM NaPP	20	7,5	$k_1=2,2x10^{-5}$ $k_s=1,2x10^{-3}$	

Pike und Briggs/ 1972a	Secale cereale (Roggen)	240000	bis max. 10h	100mM NaPP	5	7,8	$k_l=5,3x10^{-5}$ $k_s=1,7x10^{-3}$	Kein Unterschied zwischen 665 und 730nm; keine pH-Abhängigkeit. Die k-Werte sind auf log-Basis angegeben und sind hier auf ln-Basis umgerechnet.
					15	7,8	$k_l=9,4x10^{-5}$ $k_s=2,5x10^{-3}$	
					25	7,8	$k_l=2,3x10^{-4}$ $k_s=6,4x10^{-3}$	
				100mM NaPP, 5mM $Na_2S_2O_4$	5	7,8	$k_l=2,91x10^{-4}$ $k_s=1,0x10^{-2}$	
		60000	bis max. 10h	100mM NaPP	5	7,8	$k_l=5,1x10^{-5}$ $k_s=1,5x10^{-3}$	
Pratt/1975a	Avena sativa (Hafer)	240000	bis max. 18h	60mM KPP	4	7,8	$k_s=5,7x10^{-3}$ bei 665nm	nur in EDTA-freiem Medium
							$k_s=8,8x10^{-3}$	nur in EDTA-freiem Medium und unter der Voraussetzung zweier Populationen P_{fr}
diese Arbeit	Avena sativa (Hafer)	240000	20min.	10mM Tris-Cl, 10mM KCl, 1mM EDTA, 1mM NaN_3 =Puffer^3	4	7,0	665nm: $k_l=2,3x10^{-5}$ $\bar{k}_s=1,5x10^{-2}$ 730nm: $k_l=-3,9x10^{-5}$ $\bar{k}_s=-1,0x10^{-2}$	Die langsamste Komp.(bis 48h) ist hierin nicht enthalten;als Endpunkt der Gesamtkinetik ist P_{fr} unterstellt, für andere Endpunkte gilt die Umrechnung gemäß Kap.II,9.3.
					25	7,0	665nm:	

			$\bar{k}_s = 1,7 \times 10^{-2}$ 730nm: $k_l = -8,8 \times 10^{-5}$ $\bar{k}_s = -1,5 \times 10^{-2}$
	4	8,0	665nm: $k_l = 1,2 \times 10^{-4}$ $\bar{k}_s = 1,5 \times 10^{-2}$ 730nm: $k_l = -1,0 \times 10^{-5}$ $\bar{k}_s = -1,0 \times 10^{-2}$
1:1,v:v, Puffer: Glycerin	4	7,0	665nm: $k_l = 9,6 \times 10^{-5}$ $\bar{k}_s = 1,4 \times 10^{-2}$ 730nm: ca. 100sec. Zunahme der Extinktion
		6,0	665nm: $k_l = 9,6 \times 10^{-5}$ $\bar{k}_s = 1,4 \times 10^{-2}$ 730nm: $k_l = -6,6 \times 10^{-5}$ $\bar{k}_s = -1,2 \times 10^{-2}$

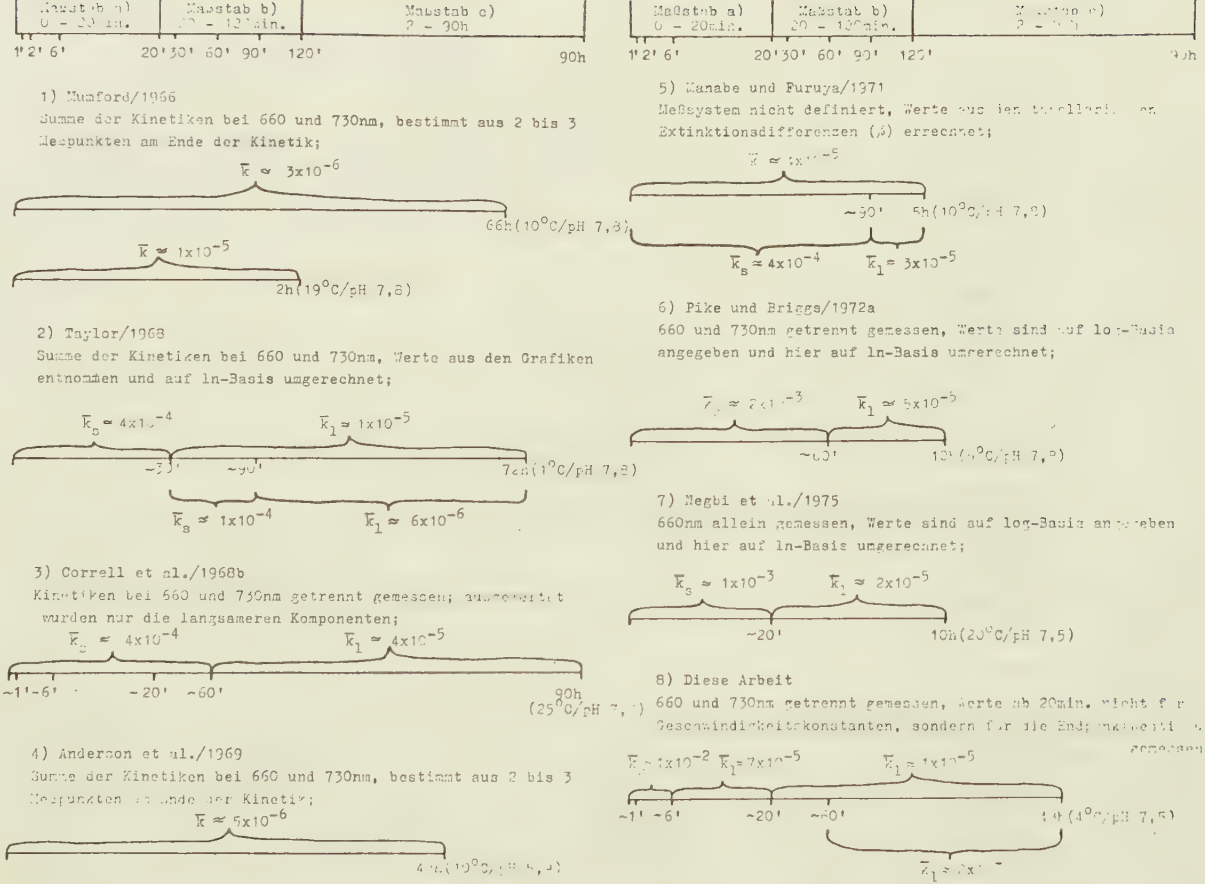


Abb.28) Lineare Darstellung von Meßzeiten bzw. kinetischen Komponenten der Dunkelreversion aus der Literatur sowie zugehörige Geschwindigkeitskonstanten und Meßbedingungen.

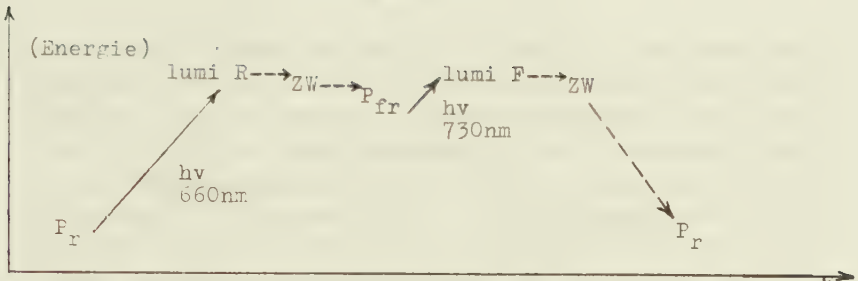
Wesentlichen mit ähnlichen Ergebnissen. Unklarheit besteht jedoch darüber, zu welchem Zeitpunkt die Trennung zwischen der langsamsten kinetischen Komponente und der nächstschnelleren anzusetzen ist, nämlich bei 20 bis 30min. oder bei 1 bis 1,5h oder ob es sich hierbei bereits um drei verschiedene Komponenten handelt. Im Unterschied dazu wurde in der vorliegenden Arbeit auf die früheren und schnelleren kinetischen Prozesse Wert gelegt. Nicht untersucht wurde allerdings eine sehr schnelle kinetische Komponente, die bereits nach ca. 1min. abgeklungen ist, da ihre Bestimmung mit der vorliegenden Meßmethode zu ungenau ist. Untersucht wurden die nächste Komponente, die bei etwa 6min. abgeklungen ist und der folgende Zeitraum bis ca. 20min. Längere Messungen wurden zunächst nur zur Bestimmung von Endpunkten der Kinetik durchgeführt; die Geschwindigkeitskonstanten, die sich daraus errechnen lassen, stimmen dimensionsgemäß mit den Geschwindigkeitskonstanten für die langsamste Komponente ('Mumford-Typ') überein.

Auch zur Interpretation der Dunkelreversion gibt es sehr verschiedene Auffassungen. Die wichtigsten seien hier zusammengefaßt. 1) Nach Mumford/1966 ist die Dunkelreversion eine einfache und direkte spontane Umwandlung von P_{fr} in P_r. 2a) Nach Correll et al./1968b ist die von ihnen gefundene komplexe Kinetik mit unterschiedlichem Verlauf bei 580 - 600nm, 660nm, 670nm und 730nm durch vier verschiedene Chromophore erklärbar. 2b) Pratt/1975a postuliert aufgrund einer von ihm bei hochmolekularem Phytochrom neu entdeckten zusätzlichen schnellen Komponente verschiedene Populationen von P_{fr} oder verschiedene Chromophore. 3) Pike und Briggs/1972a diskutieren verschiedene Populationen von P_{fr}. 4a) Taylor/1963 interpretiert die komplexe Kinetik als ein Zusammenspiel aus revertierendem P_{fr} und revertierenden Intermediaten. Anderson et al./1969 diskutieren aufgrund ihres Befundes, daß die Kinetik im Sauren beschleunigt wird, einen Prozeß, der über ein 'P_{fr}-H' Intermediat verläuft. 4b) Eine weitere Variante des Intermediate-Modells leiteten Mumford und Jenner/1971 aus ihrem Befund einer durch reduzierende Agentien beschleunigten Dunkelreversion her: sie postulierten ein Redox-Intermediat.

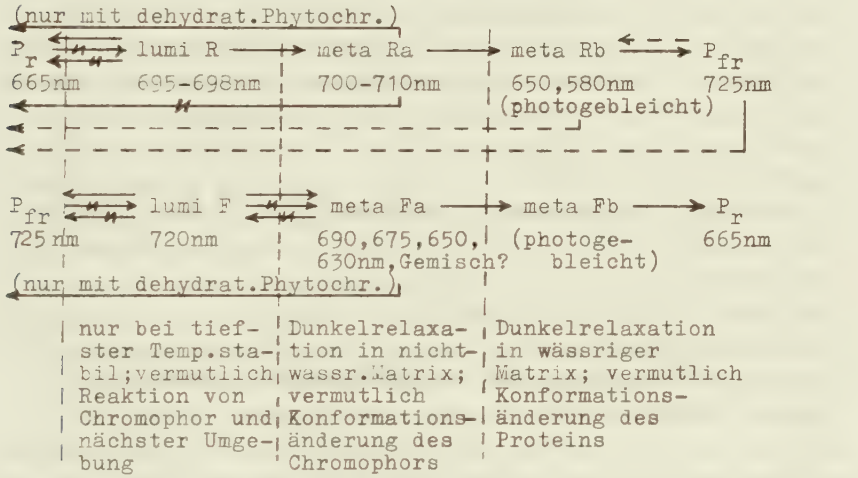
Die Vorstellung einer einfachen Umwandlung von P_{fr} in P_r wie bei Mumford/1966 kann aufgrund der hinlänglich gesicherten komplexen Kinetik der Dunkelreversion inzwischen ausgeschlossen werden. Eine Diskussion verschiedener Chromophore wie bei Correll et al./1968b ist durch die Untersuchungen zur Chromophorzahl in dieser Arbeit (Kapitel III, Punkt 1.1) auszuschließen. Lediglich die Annahmen, die Pratt für hochmolekulares Phytochrom diskutiert, sind nicht ganz auszuschließen. Da sich die bei Pratt gefundenen Anomalien durch 1mM EDTA vollständig unterdrücken lassen, wurde bei den Messungen in dieser Arbeit prinzipiell darauf geachtet, daß die Lösungen EDTA enthielten. Die von Pike und Briggs diskutierten verschiedenen Populationen von P_{fr} und P_{fr}' müßten weitestgehend identische Spektraleigenschaften besitzen und sich ebenfalls bei der Phototransformation identisch verhalten. Solche Populationen können entweder Varianzen des Chromophors (Konformation, Ladung etc.) oder des Apoproteins (Isoproteine) sein. In der Dunkelreversion sollten sich die unterschiedliche Wechselwirkung von Chromophor und Protein in deutlich verschiedenen Kinetiken bemerkbar machen. Da Pike und Briggs weiterhin zeigen können, daß die prozentuale Verteilung zwischen den Populationen sich durch Zugabe von Reduktionsmittel variieren läßt, müssen diese Populationen untereinander im Gleichgewicht stehen, so daß es sich mithin um Intermediate auf der Stufe des P_{fr} handeln muß. Es reduziert sich damit die Fragestellung auf die Beteiligung von Intermediaten und die Wechselwirkung von Protein und Chromophor.

1.1.2) Intermediate

Intermediate zwischen P_r und P_{fr} wurden bislang mit vier verschiedenen Methoden untersucht (Review-Artikel: Kendrick und Spruit/1977): Blitzlichtphotolyse, Tieftemperaturmessungen, Dehydratation sowie "Pigmentcycling", i.e. gleichzeitige Anregung von P_r und P_{fr} bzw. von Hin- und Rückreaktion, was zur Anhäufung langsamer Komponenten führt. Diese Untersuchungen ergeben zusammengefaßt etwa folgende Schemata (Schema 3 und 4), die in Einzelheiten nicht vollständig gesichert sind. Die angegebenen Wellenlängen geben nur die ungefähre Lage der Maxi-



Schema 3) Thermodynamischer Verlauf der Phototransformation (ZW = Zwischenstufen).



Schema 4) Darstellung und Nomenklatur der Phototransformation nach Kendrick und Spruit/1977; gestrichelt ergänzt sind die Dunkelreversion von P_{fr} nach P_r, die bei Cross et al./1968 beschriebene Dunkelreaktion von meta Rb nach P_r und die bei Burke et al./1972 beschriebene Dunkelreaktion von P_{fr} nach meta Rb. Meta Rb heißt in der Literatur oft P_{bl} ($\hat{=}{}^{fr}P_{bleached}$) oder $P_{fr}H$ (protonierte Form von P_{fr}).
Reaktionen, die mit einem kleinen Blitz gekennzeichnet sind, sind photochemische Prozesse, alles andere sind Dunkelreaktionen.

ma an, da sie im Wesentlichen aus Differenzspektren ermittelt sind. Welche chemische Strukur diesen Intermediaten zukommt ist völlig offen. Bei Temperaturen unterhalb von -5°C ist die vollständige Phototransformation unterbunden (Spruit und Kendrick/1973). Allgemein absorbieren die Zwischenstufen im Ver-

gleich zu P_r oder P_{fr} weniger stark. Der Übergang von meta Fa (evt. auch meta Fb) nach P_{fr} gilt als 'inverse dark reversion' und wird in vivo bei Phytochrom in Samen gefunden. Autoren, die mit lyophilisiertem Phytochrom in Glycerin arbeiten, finden ausgehend von P_{fr} stets diesen Prozeß. Balangé/1974 hat nachgewiesen, daß bei dehydratisierenden Bedingungen wie sie in dieser Arbeit gewählt wurden (1 : 1, v : v, Pufferlsg. : Glycerin) keine 'inverse dark reversion' auftritt. Sehr wohl sind diese Bedingungen jedoch geeignet die Anhäufung von Intermediaten unter Bedingungen des Pigmentcycling zu erhöhen (Briggs und Fork/1969). Briggs und Fork erhalten bei kombinierter HR- und DR-Einstrahlung von 2sec. mit 1300 W/m^2 eine Absorptionszunahme im Bereich von meta R_b mit Halbwertszeiten bis zu 1,2sec. (in einer Pufferlsg. pH 7,8/4°C) und mit Intermediatmengen von ca. 10% des Gesamtphytochroms. Kendrick und Spruit/1973 konnten bei 1min. Weißlicht von 0,73 W/m^2 ca. 60% des Phytochroms als stark gebleichte Intermediate mit Abklingzeiten von einigen Minuten anhäufen (in v : v, 3 : 1, Pufferlsg. : Glycerin pH 7,8/0°C). Ähnliches läßt sich für diese Arbeit erwarten, wo mit HR-Licht (64 W/m^2) saturierend belichtet wird (1,5 bis 2,5min.): "Since P_{fr} absorbs substantially at 660nm, it is well known that complete transformation of P_r to P_{fr} is not possible... Thus one would expect to see some consequences of cycling with red light, including at least a low level of intermediates" (Briggs und Fork/1969). Während Briggs und Fork wie auch Kendrick und Spruit vorallem meta Rb und in kleineren Mengen meta Ra anhäuften können hier aufgrund anderer Bedingungen prinzipiell auch Intermediate der Transformation von P_{fr} nach P_r auftreten.

Weniger gut vergleichbar sind die Befunde zu Intermediaten, die sich aus Experimenten mit Blitzlichtphotolyse und Tieftemperatur ergeben. Cross et al./1968 fanden z.B. bei Tieftemperaturversuchen Halbwertszeiten im Bereich von Sekunden bis Minuten. Bei -30°C fanden sie für den Übergang von meta Ra nach meta Rb eine Halbwertszeit von 10min.; eine ähnliche Größenordnung ermittelten sie bei -10°C für die Disproportionierung von meta Ro nach P_r und P_{fr} (gemessen in v : v, 1 : 1,

Glycerin : Pufferlsg. pH 7,8). Burke et al./1972 fanden noch bei 4°C ein Gleichgewicht zwischen meta Rb und P_{fr}. Da die kinetische Richtung bei Tieftemperaturmessungen streng definiert ist durch das jeweils nächstfolgende thermodynamisch stabile Produkt, ist die Produktenfolge lumi R, meta Ra, meta Rb, P_{fr} bzw. lumi F, meta Fa, meta Fb, P_r gleichbedeutend mit der energetischen Folge.
Bei Experimenten mit Blitzlichtphotolyse werden allgemein Prozesse im Bereich von msec. bis sec. beobachtet (Linschitz und Kasche/1967, Linschitz et al./1966 mit einem HR-Blitz von 5 µsec. in Pufferlsg. pH 7,8 bei 0 bis 5°C). Gardner und Briggs, 1974 haben bei einem HR-Impuls von 500msec (4 W/m^2) in Pufferlsg. pH 7,8/1°C die Halbwertszeit für das Abklingen der Intermediate im nahen UV mit ca. 5sec. ermittelt. Pratt und Butler/1970 haben bei einem HR-Impuls von 400 µsec. (in v : v, 3 : 1, Glycerin : Pufferlsg. pH 7,8) bei 0°C für den langsamsten kinetischen Schritt eine Halbwertszeit von 20sec. gefunden. Da Linschitz et al./1966 für die erste kinetisch verzögerte Phase von lumi R nach meta Ra eine Halbwertszeit von ca. 20msec. ermittelten, muß man prinzipiell bereits bei Belichtungszeiten länger als 20msec. mit einer Anhäufung von Intermediaten rechnen. Da ferner nach ca. 5sec. bereits merklich P_{fr} gebildet wird, muß man bei Belichtungszeiten länger als 5sec. mit Pigmentcycling rechnen. Insgesamt aber können die Befunde bei der Blitzlichtphotolyse noch weniger als die bei Tieftemperaturmessungen mit Dunkelkinetiken gleichgesetzt werden, da der Prozeß photochemisch in der Richtung P_r-P_{fr} (bzw. P_{fr}-P_r) getrieben wird.

1.1.3) Fragestellung

Für diese Untersuchung geht es darum, die Dunkelprozesse nach saturierender HR-Belichtung in Hinblick auf die verschiedenen Parameter, die hier eine Rolle zu spielen scheinen (Temperatur, pH-Wert, Dehydratation, Wellenlängenabhängigkeit, Redoxpotential, Molekulargewicht etc.) im frühen kinetischen Verlauf zu überprüfen. Dabei soll geklärt werden, inwieweit das Konzept der Dunkelreversion als Nettoumwandlung von P_{fr} in P_r haltbar ist und inwieweit dabei Intermediate eine Rolle spielen, wobei neben der detaillierten Analyse der Wellenlängen 665 und 730nm

auch für Intermediate wichtige Wellenlängen wie 420, 580, 710 und 698nm einbezogen werden. Daraus müßten sich auch Konsequenzen für die Mechanistik der Transformation von P_r und P_{fr} und die Wechselwirkung von Protein und Chromophor ergeben. Schließlich stellt sich hier auch die Frage nach den Spektraleigenschaften von Phytochrom, wobei gegebenenfalls auch P_r mit analogen Experimenten zu untersuchen ist.
Verwendet wurde für diese Untersuchung - soweit nicht anders angegeben - Phytochrom, das nach Maßgabe der G 200-Molekulargewichtsanalyse (vgl.Kap.II, Punkt 2) zu 75 bis 100% aus hochmolekularem Phytochrom bestand.

1.2) Die Dunkelreversion. Ein Sonderfall

Wenn das Konzept der Dunkelreversion als Nettoumwandlung von P_{fr} in P_r Gültigkeit haben soll, müssen drei Bedingungen erfüllt sein: 1) Das Verhältnis der Geschwindigkeitskonstanten bzw. Halbwertszeiten bei 665 und 730nm muß stets ca. 1 : 1 sein, 2) Eine Anderung des Milieus (wie pH-Wert, Temperatur, Lösungsmittel) sollte, wenn überhaupt, die Kinetiken bei 665 und 730nm in gleicher Weise beeinflussen, 3) Die Reaktion sollte vollständig ablaufen, d.h. der Endpunkt der Kinetik sollte P_r sein.
Keine dieser drei Forderungen ist erfüllt. Abb.29) zeigt das Verhältnis der Halbwertszeiten $t_{1/2}$665nm/$t_{1/2}$730nm sowohl für die langsame wie für die schnelle Komponente bei verschiedenen pH-Werten unter sonst gleichen Bedingungen (4°C/ Pufferlsg.). Lediglich bei pH 6 besteht eine annähernde Übereinstimmung. Änderungen des Milieus wie pH-Wert oder Lösungsmittel verändern die Halbwertszeiten gegensinnig wie die Abb. 30) und die Abb.31) für unterschiedliche pH-Werte und verschiedene Lösungen zeigen. Bei 665nm nimmt die Geschwindigkeit der langsamen Kinetik in Pufferlsg. mit steigendem pH-Wert zu, in glycerinhaltiger Lösung ab.Umgekehrt bei 730nm, dort nimmt die Geschwindigkeit der langsamen Kinetik in Pufferlsg. mit steigendem pH-Wert ab, in glycerinhaltiger Lösung zu. (Ab pH 8 treten durch oxidative Einflüsse sprunghafte Veränderungen auf, die deshalb nicht herangezogen werden können).

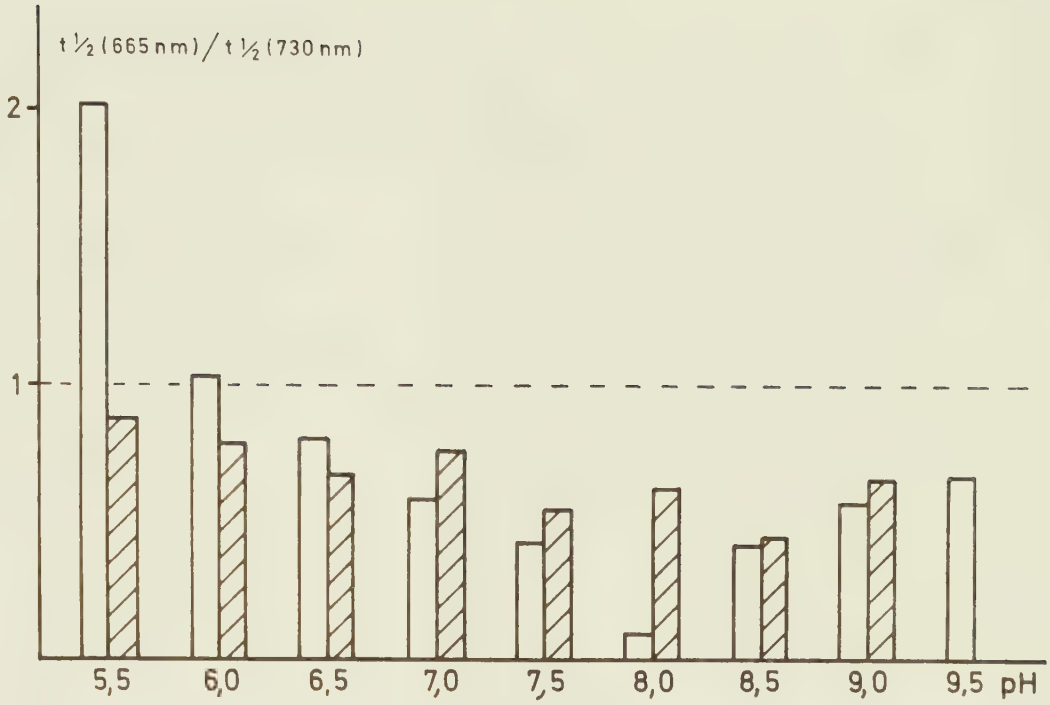


Abb.29) Dunkelrelaxation von hochmolekularem Phytochrom. Verhältnis der Halbwertszeiten t/2(665nm):t/2(730nm) in Abhängigkeit vom pH-Wert (in Pufferlsg./4°C). Schraffiert: schnelle Komponente; weiße Balken: langsame Komponente.

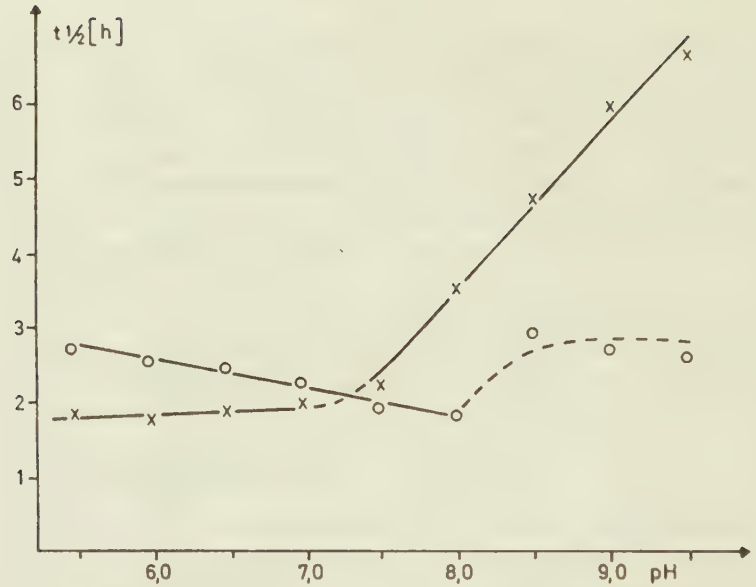


Abb.30) Dunkelrelaxation von hochmolekularem Phytochrom (bei 4°C). Halbwertszeiten der langsamen Komponente bei 665nm: o-o-o in Pufferlösung; x-x-x in Puffer + Glycerin (1 : 1/v : v).

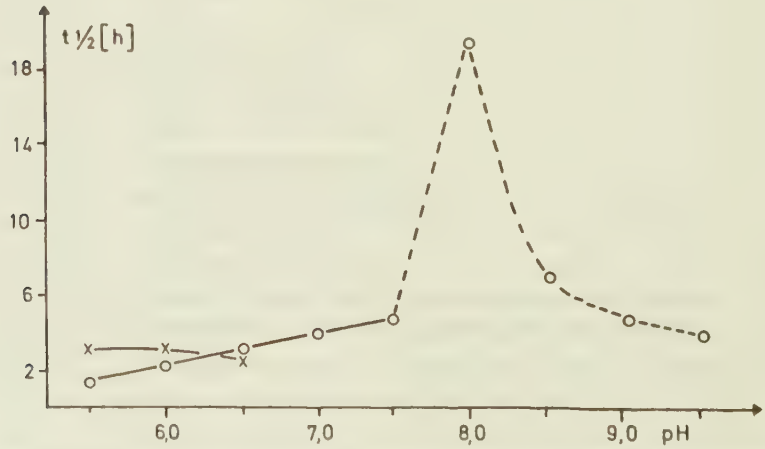


Abb.31) Dunkelrelaxation von hochmolekularem Phytochrom (bei 4°C). Halbwertszeiten der langsamen Komponente bei 730nm: o-o-o in Pufferlösung; x-x-x in Puffer + Glycerin (1 : 1/v : v).

Bei der Kontrolle des Endpunkts der Kinetiken zeigt sich, daß neben der Ausbildung von P_r stets ein Rest von P_{fr} verbleibt. Nach sättigender Belichtung mit HR-Licht stellt sich der Endpunkt der Kinetik nach ca. 48h ein, wobei noch ca. 30% des Gesamtphytochroms als P_{fr} vorliegen. Der Ausgangspunkt der Kinetiken ist stets das photostationäre Gleichgewicht nach sat. HR-Licht und die beobachteten Dunkelrelaxationen können durch wiederholte Bestrahlung revertiert werden (s. Abb.32). Das Konzept der Dunkelreversion betrachtet die Dunkelkinetik als Prozeß zwischen dem photostationären Gleichgewicht nach saturierend HR-Licht (25% P_r/75% P_{fr}) nach Butler et al./1964 und Pratt/1975b und dem photostationären Gleichgewicht nach saturierend DR-Licht (99% P_r/1% P_{fr}) nach Butler et al./1963 und Kasperbauer et al./1963. Offenbar liegt hier aber ein Prozeß zwischen dem photostationären Gleichgewicht nach saturierendem HR-Licht und dem thermodynamischen Gleichgewicht nach der anschließenden Dunkelrelaxation vor. Die Dunkelkinetiken werden deshalb im folgenden nur noch als Dunkelrelaxationen diskutiert. Die im pH-Bereich von 6,8 annähernd verwirklichte Übereinstimmung der Kinetiken stellt dabei nur den Spezialfall einer scheinbaren Dunkelreversion dar.

1.3) Dunkelrelaxation von P_r

Nachdem der Endpunkt der Dunkelrelaxation von HR bestrahltem Phytochrom nicht P_r ist, sondern ein thermodynamisches Gleichgewicht aus P_r und P_{fr}, stellt sich die Frage, ob das nach saturierender DR-Belichtung ausgebildete P_r über längere Zeit (48h oder mehr bei 4°C) stabil ist. Dazu durchgeführte Versuche zeigten zunächst ein verblüffendes Ergebnis. Phytochromproben, die als P_r aufbewahrt waren, ließen sich nach saturierender HR-Belichtung zwar qualitativ aber nicht quantitativ vollständig zum Ausgangsspektrum konvertieren, was einen gewissen Verlust an Phytochrom, bedingt durch die Phototransformation, anzudeuten scheint. Dieser scheinbare Verlust an Phytochrom (ca. 10 - 15%) verschwindet im Dunkeln im Verlauf mehrerer Tage (Endpunkt nach ca. 3 Tagen), indem die Absorption bei $P_r$max langsam ansteigt, ohne daß sonst eine auffällige Veränderung im Spektrum festzustellen wäre.[2)] Es gibt für

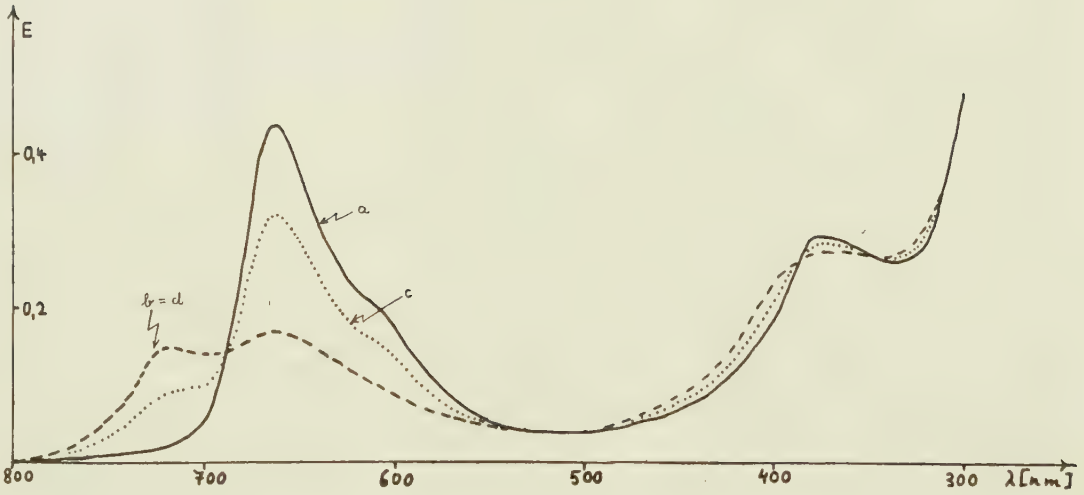


Abb.32) Absorptionsspektren von Phytochrom (MG = 60000) bei 4°C in Pufferlsg.; a) P_r-Spektrum, b) P_{fr}-Spektrum, c) nach 5h Dunkelrelaxation, d) mit HR-Licht wieder zum P_{fr} zurückbelichtet.

dieses Phänomen nur zwei Erklärungen, entweder ist das verwendete DR-Filter nicht deutlich genug vom Absorptionsbereich des P_r im Hellroten getrennt (wenngleich dann eine kleine P_{fr}-Schulter sichtbar sein sollte) oder es sind durch die vorausgegangene HR-Belichtung 10 - 15% Intermediate in weitgehend photogebleichten Formen akkumuliert, die mit DR-Licht nicht konvertierbar sind.

Um die erstere Möglichkeit zu prüfen, wurden folgende Experimente durchgeführt. Einmal wurde Phytochrom, das als P_r aufbewahrt war mit einer DR-Dosis bestrahlt, die für eine sättigende DR-Belichtung nach vorhergehender HR-Belichtung notwendig ist. Bei einer solchen Belichtung geht die Absorption im P_r-Maximum um 2 - 3% zurück; dieser Betrag ist offenbar dem HR-Anteil des verwendeten DR-Filters geschuldet, kann aber nicht den Gesamteffekt von 10 - 15% erklären. Belichtungsversuche mit Cut-Off-Filtern mit $T_{50\%}$ bei 780 und 830nm (Fa. Schott RG 780 und RG 830) zeigten, daß sich dieser Effekt von 2 - 3% eliminieren läßt, wenn der HR-Anteil unterdrückt wird; allerdings sind die Belichtungszeiten von mehreren Stunden nicht praktikabel. Mit einem Interferenzfilter von 764nm konnte derselbe Effekt erzielt werden; allerdings war auch hier noch eine Belichtungszeit von ca. 3h nötig. Gleichzeitig stellte sich noch ein weiterer Effekt ein: der Endwert des P_r- Maximums, der sich hierbei einstellt ist nicht identisch mit dem P_r-Wert, der sich im Dunkeln einstellt, sondern ist nochmals 2 - 3% höher; dieser P_r-Wert ist im Dunkeln nicht stabil, sondern nimmt um eben diesen Betrag wieder ab (binnen ca. 24h). Auf diese Weise optimal zum P_r rückbelichtetes Phytochrom zeigt auf der langwelligen Seite eine etwas steilere Flanke als Phytochrom, das mit einem normalen DR-Filter rückbelichtet wurde; ob der Unterschied bei den beiden Formen der Belichtung ausschließlich auf einen P_{fr}-Rest zurückgeht sei trotzdem dahingestellt, da hier eine Beteiligung von Intermediaten im Rotbereich möglich ist.

---

2) Setzt man Phytochrom einer vielfach saturierenden HR-Belichtung aus, wird dieser Verlust an sichtbarer Absorption größer und führt zu zunehmend irreversibler Schädigung.

Zusammengefaßt ergibt sich folgendes Bild. Das normale DR-Filter hat einen HR-Anteil, der einen P_{fr}-Rest von 2 - 3% beläßt; wenn man annimmt, daß das gebildete P_{fr} nach einer Dunkelperiode großenteils zu P_r relaxiert, werden folglich im saturierenden HR-Licht wie es hier verwendet wird 8 - 13% stark photogebleichte Intermediate gebildet, die im DR-Licht nicht konvertierbar sind. Diese Intermediate relaxieren langsam zu P_r. Wenn man eine solche im Dunkeln als P_r gelagerte Phytochromprobe mit DR-Licht jenseits 730nm belichtet, erreicht man das photostationäre Gleichgewicht nach saturierend DR-Licht (100% P_r). Läßt man eine solche Probe im Dunkeln stehen (ca. 24h), relaxiert sie wieder zum Dunkelgleichgewicht nach saturierend DR-Licht (97 - 98% P_r/2 - 3% P_x). Weiterhin heißt das, daß man sowohl nach saturierend HR- wie DR-Licht zwischen dem photostationären Gleichgewicht und dem thermodynamischen Dunkelgleichgewicht unterscheiden muß. Zudem erlauben diese Ergebnisse eine Quantifizierung der Untergrenze an Intermediaten, die bei saturierender HR-Belichtung gebildet wurden, nämlich mindestens 8%. Dies hat aber eine weitere Konsequenz für das photostationäre Gleichgewicht nach HR-Licht. Nach Pratt/1975b beträgt dies für das hier verwendete hochmolekulare Phytochrom 25% P_r/75% P_{fr}. Da sich der P_r-Anteil aus dem gesicherten P_r-Spektrum ergibt, bleibt er unberührt. Somit ergibt sich: 25% P_r + < 67% P_{fr} + > 8% stark photogebleichte Intermediate. Die Tatsache, daß P_r bei sehr vorsichtiger DR-Belichtung eine höhere Extinktion erreicht als normalerweise gefunden, ist zudem ein weiterer Hinweis auf einen höheren Extinktionskoeffizienten von $P_r$max. Weiterhin impliziert ein geringerer P_{fr}-Anteil im photostationären Gleichgewicht einen höheren P_{fr}-Extinktionskoeffizienten.

1.4) Langlebige Intermediate

Bei der Belichtung von P_r mit saturierendem HR-Licht entstehen offenbar größere Mengen langlebiger Intermediate. Im Folgenden wird versucht aus dem kinetischen Verhalten bei unterschiedlichen Bedingungen aufzuklären, welche Intermediate hierbei eine Rolle spielen (soweit die bekannten Inter-

mediate die Befunde erklären können). Herangezogen werden hierfür die Abhangigkeit der Kinetiken von der Wellenlänge, der Temperatur, der Hydratation und dem pH-Wert. Sämtliche Einzeldaten hierzu sowie deren Faktorenanalyse finden sich im Tabellenanhang.
Bei 25°C ist zu erwarten, daß die Kinetiken relativ rasch ablaufen und Intermediate relativ wenig ins Gewicht fallen. Dies ist in der Tat der Fall. In der Regel ist die langsame wie die schnelle Kinetik bei 25°C schneller als bei 4°C und wiederum schneller als bei -10°C (z.B.: Tab. 21, 17, 25 und 44). Teilweise ist jedoch die Kinetik bei bestimmten Wellenlängen bei tieferer Temperatur schneller. So ist z.B. die langsame Komponente (gemessen in Pufferlsg.) bei 665nm/ pH 8 und bei 730nm/pH 6 bei 4°C etwas schneller als bei 25°C (665nm/pH 8: $t/2(4°C)=1,66h$, $t/2(25°C)=1,73h$; 730nm/pH 6: $t/2(4°C)=2,16h$, $t/2(25°C)=3,14h$). Ein Paradoxon, das in ähnlicher Weise schon Anderson et al./1969 fanden. Dies ist darauf zurückzuführen, daß scheinbare P_r-Bildung und scheinbare P_{fr}-Abnahme variieren je nach dem Gehalt an Intermediaten in der Lösung. Wenn man die Werte bei 25°C untereinander vergleicht ist die einzige Unregelmäßigkeit die offensichtlich schnellere Kinetik bei 665nm als bei 730nm (s.Tab 21 bis 24).

Bei -10°C (gemessen in glycerinhaltiger Lösung) ist die Phototransformation nicht mehr vollständig (Spruit und Kendrick/1973). Es ist deshalb nicht verwunderlich, daß hier ein völlig abnormales kinetisches Verhalten auftritt: bei 665 wie bei 730nm nimmt die Absorption zu, außerdem nimmt die Absorption bei 420nm im Sauren schwach zu, die Absorption bei 580nm im Basischen schwach ab (s.Tab.25, 26 und 40). Hier wäre also zu erklären, wie sich aus einer offenbar stark photogebleichten spektralen Form eine starke Zunahme bei 665 und 730nm speist. Dabei ist auffällig, daß die Zunahme bei 730nm im Basischen deutlich verstärkt ist und mit der dort sichtbaren Abnahme bei 580nm korrelliert, während im Sauren möglicherweise eine Konkurrenz mit 420nm vorliegt. Als Kandidat für die Absorption bei 580nm kommt eigentlich nur meta Rb in Frage, wenn man von einer unvollständigen Phototransformation

ausgeht. Zudem wurde schon bei Cross et al./1968 die Disproportionierung von meta Rb in P_r und P_{fr} beschrieben. Zusätzlich taucht hier als neue Kinetik die Zunahme bei 420nm auf. Eine solche Zunahme wäre bei der Ausbildung von P_{fr} normal, verläuft aber gerade entgegengesetzt dem kinetischen Verhalten bei 730nm. Ein Gallenfarbstoff mit dieser Absorption wäre ein Rubin-Typ, bei dem die Konjugation zwischen Ring B und C unterbrochen ist. Als Intermediat wurde diese Wellenlänge bislang nicht beschrieben.
Bei 4°C zeigt das kinetische Verhalten ebenfalls eine Abhängigkeit vom pH-Wert wie bereits in Abb.30) gezeigt. Die Unterschiede sind zum Teil nicht sehr groß, aber es ergibt sich z.B. von pH 6 nach pH 7 und von pH 7 nach pH 8 (langsame Kinetik/Pufferlsg./665nm) eine Signifikanz von 75%, ebenso von pH 6 nach pH 7 bei 730nm, sowie von pH 7 nach pH 8 bei 730nm eine Signifikanz von 87,5%. In der Regel sind Kinetiken in relaxierender glycerinhaltiger Lösung erwartungsgemäß langsamer als in Pufferlösung. Bei 4°C gibt es hier einige Überschneidungen. So ist z.B. die langsame Komponente bei 665nm im Sauren in glycerinhaltiger Lösung etwas schneller als in Pufferlösung (Pufferlsg.: $t_{1/2}$ = 2,5h; glycerinhaltige Lösung: $t_{1/2}$ = 1,81h). Daß auch hierbei wieder das Ungleichgewicht zwischen P_r-Bildung und P_{fr}-Abnahme eine Rolle spielt, kann man sehr schön bei 730nm in glycerinhaltiger Lösung verfolgen. Im Basischen ist eine normale kinetische Auswertung nicht mehr möglich, da, ähnlich dem bei -10°C beobachteten Phänomen, die Extinktion bei 730nm zunächst leicht ansteigt und dann erst sehr langsam in eine Abnahme übergeht (s.Abb.33). D.h., daß hier bei 730nm eine kurzlebige ansteigende und eine langlebige abnehmende Komponente in Konkurrenz stehen. Die Verlangsamung der langsamen Kinetik bei 730nm in Pufferlösung ist wahrscheinlich auf denselben, nur nicht so ausgeprägten Effekt zurückzuführen. Bei 420 und 580nm ist hier keine Anomalie festzustellen.[3)] Eine genauere Analyse der beiden bei 730nm in Konkurrenz stehenden kinetischen Komponenten ermöglicht der Vergleich mit den benachbarten Wellenlängen 710 und 698nm. Dies ist ein Wellenlängenbereich, der für die anderen bekannten Intermediate beschrieben ist: lumi R

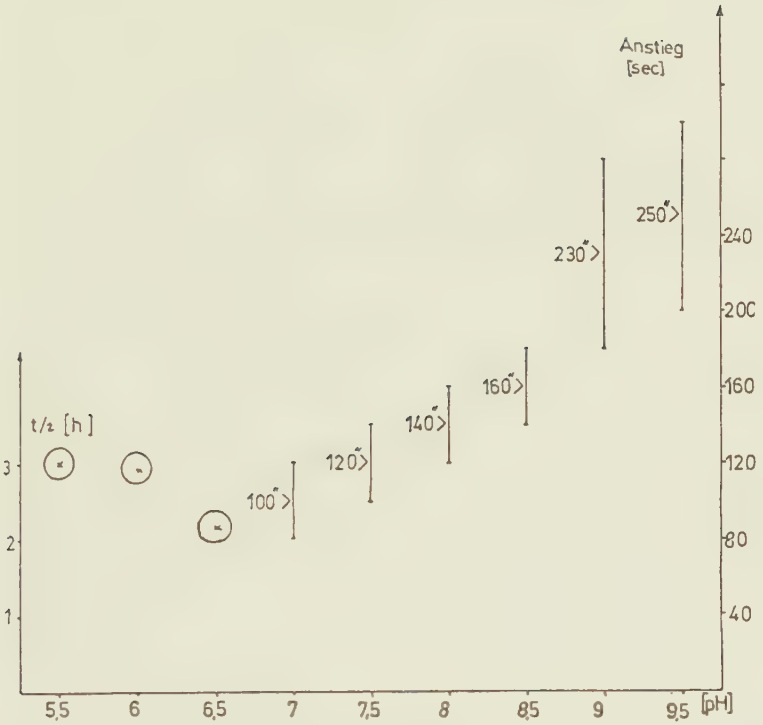


Abb.33) Dunkelrelaxation von hochmolekularem Phytochrom. Kinetik bei 730nm in Puffer + Glycerin (1:1/v:v) bei 4°C: Halbwertszeiten (h) der langsamen Komponente (Kreise) bzw. Anstiegszeiten (sec.).

(698nm), meta Ra (710nm), lumi F (720nm), meta Fa (690nm). Die im Anhang (Tab.27) zusammengestellten Werte für 730, 710, 698 und teilweise 720nm (in glycerinhaltiger Lösung) zeigen deutlich, daß der bei 730nm beschriebene Effekt bei 720, 710 und 698nm zunehmend verstärkt auftritt. D.h., daß die mit der Extinktionsabnahme bei 730nm konkurrierende ansteigende Komponente bei kürzerer Wellenlänge liegt. Wo das Maximum dieser Komponente genau liegt und ob es sich nur um eine Komponente handelt,muß offen bleiben, da bei ca. 680nm der isosbestische Punkt zwischen P_r und P_{fr} liegt, so daß hier insgesamt drei gegenläufige Tendenzen sich überschneiden: eine Zunahme bei 665nm, eine Abnahme bei 725[4] bzw. 730nm und eine Zunahme bei ca. 700nm. Eine Zuordnung zu den vier genannten Intermediaten ist dementsprechend schwierig, zumal die dort angegebenen Wellenlängen auch nur die ungefähren Maxima angeben (vgl.Punkt 1.1.2). Da jedoch meta Ra und meta Fa stabiler sind als lumi R und lumi F,sind diese wesentlich wahrscheinlicher. Als Quelle für den Anstieg bei 700nm kommt entweder ein photogebleichtes Intermediat oder P_{fr} selbst in Frage. Als photogebleichtes Intermediat kommt eigentlich wieder nur meta Rb in Frage, da von meta Fb aus das Gleichgewicht vollständig auf seiten von P_r liegen sollte. Wenn von meta Rb aus ein Gleichgewicht mit meta Ra besteht, würde das mit den Befunden bei -10°C ein einheitliches Bild ergeben: In relaxierendem Medium wird verstärkt meta Rb akkumuliert, das via meta Ra zu P_r relaxieren kann.

---

3) Wenn man eine sehr konzentrierte Lösung mißt, sollte man im Normalfall bei 580nm eine Zunahme, bei 420nm eine Abnahme der Extinktion erwarten. Bei einer Probe mit $E_{P_r max}$ = 1,4 (pH 7/Pufferlsg.) wurde bei 580nm eine Zunahme gemessen, während bei 420nm erst nach ca. 40sec. sich eine Abnahme einstellte; bei 730nm wurde zunächst eine Zunahme von ca. 3mE in ca. 10sec. festgestellt, dann erst erfolgte die Abnahme der Extinktion. D.h. eine minimale Anomalie ist in der Tat sogar in Pufferlösung bei 4°C vorhanden, wobei 420 und 730nm wie bei -10°C sich gegenläufig verhalten.

Wenn zudem, wie schon bei Burke et al./1972 beschrieben, ein Gleichgewicht zwischen P_{fr} und meta Rb vorliegt, würde sich die Dunkelrelaxation als Prozeß darstellen, der von P_{fr} über die Intermediate meta Rb, meta Ra (und lumi R ??) nach P_r abläuft.
Wenn man P_{fr} als Quelle der Extinktionszunahme bei 700nm diskutiert, wäre entweder der obige Fall möglich, nämlich die Ausbildung von meta Ra via meta Rb aus P_{fr}, oder die Ausbildung von meta Fa via lumi F. Diese zweite Möglichkeit kann jedoch weitestgehend ausgeschlossen werden, da offenbar über einen Zeitraum von bis zu 5min. eine Akkumulation bei 700nm erfolgt, d.h. zwischen dem Intermediat bei 700nm und dem nachstfolgenden Produkt muß eine kinetische Barriere bestehen. Dies ist aber für die Produktenfolge (lumi F), meta Fa, meta Fb nicht der Fall. Eine sehr langsame Kinetik von meta Ra aus zu P_r (z.B. über lumi R als Barriere) würde dann die langsamste kinetische Komponente der Dunkelrelaxation definieren, während schnellere Kinetiken auf akkumulierte Intermediate zurückgehen. Dies schließt jedoch nicht aus, daß die Produktenfolge (lumi F), meta Fa, meta Fb als untergeordnetes Phänomen in kleinerem Umfang auch auftritt (z.B. bei 4°C/glycerinhaltige Lösung, wo einerseits vollständige Phototransformation erfolgt, andererseits stark relaxierende Bedingungen vorliegen).
Abb.34) zeigt das kinetische Verhalten bei 730, 710 und 698 nm in Pufferlsg. (langsame Komponente). Genauso wie bereits für 730nm beschieben verlangsamt sich die Kinetik auch bei 710 und 698nm im Basischen, wobei dieser Effekt wiederum ein Maximum bei ca. 700nm zeigt. Dies läßt nochmals den Schluß

---

4) Die hier gemessene Wellenlänge 730nm ist nicht direkt identisch mit dem P_{fr}-Maximum bei 725nm. 730nm wurde gewählt, da alle bisherigen Untersuchungen 730nm in Analogie zu den in vivo-Messungen (P_{fr}max = 730nm) kinetisch verfolgt haben und da zudem der Abstand zu den Intermediaten bei 700nm dadurch größer wird; die Kinetik selbst bleibt davon unberührt, sie ist rein mathematisch im Maximum und neben dem Maximum dieselbe.

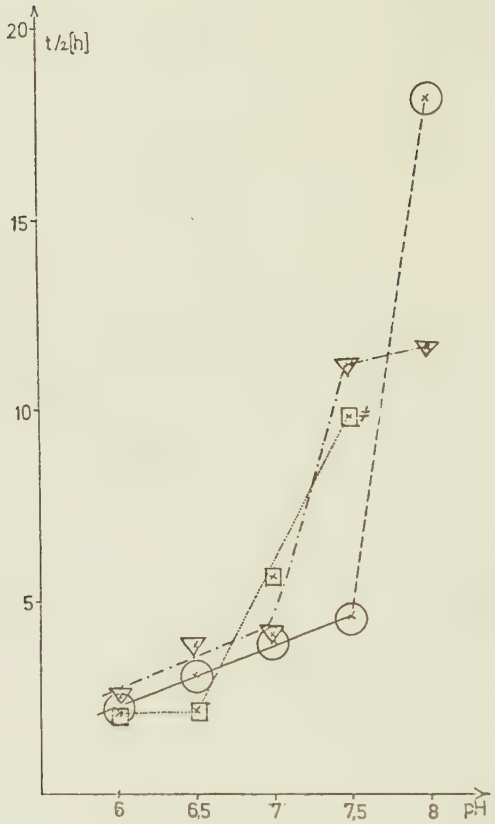
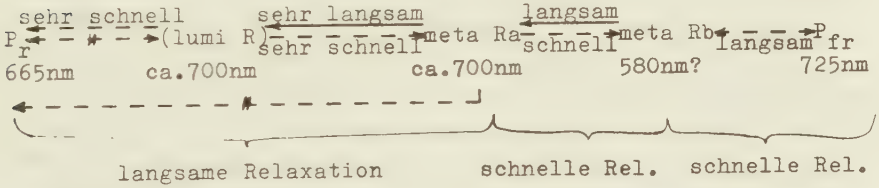


Abb.34) Dunkelrelaxation von hochmolekularem Phytochrom. Halbwertszeiten der langsamen Komponente in Pufferlsg. (4°C). Kreise: 730nm, Dreiecke: 710nm, Rechtecke 698nm; ≠ oberhalb von pH 7,5 ist die Kinetik bei 698nm so langsam, daß die rechnerische Auswertung nicht mehr sinnvoll ist.

zu, daß das in glycerinhaltiger Lösung sichtbare System aus Zunahme der Extinktion bei 700nm und Abnahme bei 730nm auch hier existent ist, nur daß die Abnahme bei 730nm bereits die Zunahme bei 700nm kompensiert, so daß sich dies nur noch in einer verlangsamten Kinetik bemerkbar macht. Daraus ergeben sich für die mangelnde Übereinstimmung von scheinbarer P_r-Bildung und P_{fr}-Abnahme zwei Ursachen. Einmal fließen (s. vorhergehender Punkt) mindestens 8% dunkelgebleichter Intermediate langsam zu P_r ab ohne vorher als P_{fr} in Erscheinung getreten zu sein. Zum anderen bedeuten intermediäre Maxima bei 700nm (und 580nm) durch die spektrale Überlappung eine erhöhte Extinktion bei 665nm. Zusammengefaßt ergibt sich für das Schema 4), daß die obere Hälfte fogendermaßen zu modifizieren ist (dick eingezeichnete Pfeile):



Schema 5) Für die Dunkelrelaxation modifiziertes Schema 4).

Weiterhin läßt sich das Schema in eine relativ langsame und zwei relativ schnelle Relaxationen zerlegen, die alle aufgrund der spektralen Überschneidungen mehr oder weniger stark die Extinktion bei 665 und 730nm beeinflussen. Es ist Es ist deshalb nicht überraschend, daß Correll et al./1968b sogar fünf verschiedene kinetische Komponenten erster Ordnung unterscheiden konnten. Nach den Beobachtungen in dieser Arbeit lassen sich bei 4°C und 25°C die schnellen primären Prozesse innerhalb der ersten 6min. kinetisch abtrennen. Die aus den nächsten 10 bis 15min. errechnete Kinetik beschreibt

das kinetische Verhalten bis ca. 5 h weitgehend korrekt. Diese beiden kinetischen Komponenten sind charakterisiert durch die Beteiligung von akkumulierten Intermediaten an der Relaxation. Die Gesamtkinetik ist in der Abklingzeit dieser Komponenten zum größten Teil abgelaufen. Die sehr langsame Kinetik bis zum Endpunkt läßt sich dann am besten mit einer kinetischen Komponente des 'Mumford-Typs' beschreiben, wie sie Mumford/1966 aus Meßpunkten nach Stunden ermittelt hat.

Die langsame und die schnelle Komponente, die in dieser Arbeit unterschieden werden, fassen also kinetische Prozesse mit unterschiedlichen Maxima zusammen. Daß dies der Fall ist, ist auch daraus zu ersehen, daß nicht nur die Geschwindigkeit sondern auch die prozentuale Verteilung der beiden Komponenten bei verschiedenen Wellenlängen verschieden ist. Die schnelle Komponente beträgt bei 665nm etwa 10% der Gesamtkinetik, bei 730nm etwa 5%; entsprechend komplementär für die langsame Komponente. Relaxierendes, glycerinhaltiges Medium oder pH-Wert zeigen auf die schnelle Komponente im Unterschied zur langsamen keinen spezifischen Einfluß. Allerdings ist die Auswertung der schnellen Komponente mit einem größeren Fehler behaftet als die der langsamen Komponente: die langsame Komponente errechnet sich aus einer Ablesereihe, die schnelle Komponente aus zwei Ablesereihen.

Ein Versuch die einzelnen Komponenten zuzuordnen könnte wie folgt aussehen. Bei saturierend HR-Licht geschieht ein Pigmentcycling, wobei vorallem das stark photogebleichte meta Rb angehäuft wird. In einer schnellen primären Reaktion wird aus meta Rb meta Ra und/oder P_{fr} gebildet, wodurch unter allen Umständen 665 und 730nm kinetisch nicht übereinstimmen und/oder drastisch sich unterscheiden. In einer langsameren Reaktion fließt akkumuliertes meta Ra zu P_r ab. Solange meta Ra nicht im Fließgleichgewicht zwischen P_{fr} und P_r steht, stimmen weiterhin die Kinetiken bei 665 und 730nm nicht überein. Erst wenn das Fließgleichgewicht herrscht mag sich so etwas wie eine sehr langsame Pseudodunkelreversion einstellen.

1.5) Einfluß weiterer Parameter. Endpunkt der Dunkelrelaxation

Da bei verschiedenen Autoren Ioneneffekte auf die Dunkelrelaxation angegeben werden, wurde in dieser Arbeit neben dem Standardpuffer auch getestet: Phosphatpuffer, Ca^{2+}, Mg^{2+}, K^{+}, Na^{+}. Alle diese Variationen zeigen keinen signifikanten Einfluß auf die Kinetik, wenn man die pH-Änderungen berücksichtigt. Lediglich bei hohen Ionenkonzentrationen (0,5M) werden die Kinetiken verlangsamt, ähnlich wie bei Zugabe von Glycerin oder Sucrose. Offenbar spielt bei der Relaxation die Viskosität die entscheidende Rolle und nicht die Depolarisation. Nicht getestet wurde der bei anderen Autoren angegebene Effekt von Fe^{3+}, Cu^{2+} (Pratt und Cundiff/1975) und Zn^{2+}, Cd^{2+} (Lisansky und Galston/1974). Durch das serienmäßig verwendete EDTA dürfte dies ohnehin ausgeschlossen sein. Nach Taylor/1968 eliminiert die Zugabe von Harnstoff die schnelle kinetische Komponente. Auch dies wurde hier nicht getestet, erscheint jedoch einleuchtend, da die schnelle Kinetik auf Intermediate zurückgeht, die besonders instabil und damit auch leicht denaturierbar sind.

Niedermolekulares und hochmolekulares Haferphytochrom verhält sich qualitativ gleich, allerdings ist hochmolekulares Haferphytochrom kinetisch etwas schneller. In Tab.10) sind zwei Meßreihen mit hoch- und niedermolekularem Phytochrom gegenübergestellt. Das arithmetische Mittel der Abweichungen in % aus Spalte 4 der Tabelle ergibt, daß hochmolekulares Phytochrom eine um ca. 14% schnellere Dunkelkinetik als niedermolekulares Phytochrom hat bzw. niedermolekulares Phytochrom eine um ca. 12% langsamere Dunkelkinetik als hochmolekulares Phytochrom hat. Da die Unterschiede nicht allzugroß sind, wurden auch Ergebnisse mit niedermolekularem Phytochrom in die Statistik aufgenommen.

Wenn mandie saturierende HR-Belichtung mit 10% der üblichen Intensität bei entsprechend längerer Belichtungszeit bewirkt, werden offenbar weniger Intermediate akkumuliert, was sich in einer etwas langsameren Gesamtkinetik bemerkbar macht: In einer Meßzeit von 16min. wurde bei 665nm in Pufferlsg. ($4^{o}C$/ pH 7,0) ein um 20% geringerer Anstieg im Vergleich zu einer

Tab.10) Vergleich zweier Meßreihen mit 100% hoch- bzw. niedermolekularem Phytochrom; k-Werte der langsamen Komponente multipliziert mit 10^5 (sec.).

	pH 6		pH 7		pH 8	
	665nm	730nm	665nm	730nm	665nm	730nm
MG = 60000	7,2	8,6	8,0	6,0	9,7	0,9
MG = 240000	8,8	9,8	8,4	4,9	12,3	1,2
Differenz: 240000 - 60000	+1,6	+1,2	+0,4	-1,1	+2,6	+0,3
Differnz(%) von 60000	+22	+14	+5	-18	+27	+33

normal belichteten Parallelprobe bestimmt. Das thermodynamische Gleichgewicht zum Schluß der Kinetik (ca.72h) scheint weitgehend unberührt zu bleiben. Der gefundene Wert bewegt sich im Rahmen der Werte bei normaler saturierender HR-Belichtung. D.h. das photostationäre Gleichgewicht ist abhängig von der Intensität der Einstrahlung, nicht oder nur geringfügig das thermodynamische Gleichgewicht. Man muß deshalb im Auge behalten, daß sich alle hier gefundenen Werte auf eine Einstrahlung mit 64 W/m^2 beziehen, was eine in der Phytochromforschung allgemein übliche Größenordnung ist.

Wenn man nicht sättigend mit HR-Licht einstrahlt, sondern nur bis zur Lage des thermodynamischen Gleichgewichts nach saturierend HR-Licht (ca. 70% P_r), läuft, bezogen auf den Anteil an belichtetem Phytochrom die Kinetik wie gehabt ab mit einem entsprechend verschobenen thermodynamischen Endpunkt. Das bedeutet, daß das thermodynamische Gleichgewicht von Phytochrom nicht im Sinne einer Stoßtheorie diskutiert werden darf. Vielmehr erzeugt ein definiertes photostationäres Gleichgewicht eine definierte Dunkelrelaxation. Die bei der Belichtung gebildeten Intermediate werden ganz zu P_r relaxieren, während das gebildete P_{fr} zu einem Aliquot zu P_r relaxiert. Dies würde aber weiterhin bedeuten, daß man es tatsächlich - allerdings auf eine etwas andere Weise - mit verschiedenen Popula-

tionen von P_{fr} zu tun hat, wie Pike und Briggs/1972a diskutiert haben: ein P_{fr}, das nicht relaxiert, und ein P_{fr}', das relaxiert. Oder aber Phytochrom ist ein Oszillator. Letzteres scheint zumindest darin angedeutet, daß nach Erreichen des Endpunkts der Kinetik die Differenz zwischen 665 und 730nm wieder etwas kleiner wird, d.h. sich gerade wie bei einem unharmonischen Oszillator verhält. Dies würde auch das Relaxationsverhalten von P_{fr} und P_r verständlich machen. Wenn man z.B. nach HR-Belichtung zu P_{fr} eine langsam abklingende Oszillation $P_{fr} \longleftrightarrow$ meta A_b annimmt, wäre ein stets konstanter Faktor von Relaxation zum P_r gewährleistet. Für den Endpunkt der Dunkelrelaxation ergeben sich demgemäß folgende Beziehungen (Tab.11).

Tab.11) Photostationäres und thermodynamisches Gleichgewicht in Abhängigkeit von der HR-Einstrahlung

Sättigung der HR-Einstrahlung	photostationäres Gleichgewicht	thermodynamisches Gleichgewicht
100%	25% P_r/65% P_{fr}/10% P_x	70% P_r/30% P_{fr}
50%	63% P_r/32% P_{fr}/5% P_x	85% P_r/15% P_{fr}
25%	81% P_r/16% P_{fr}/3% P_x	95% P_r/5% P_{fr}

Dazu ist anzumerken, daß in der Bilanz die Zunahme bei 665nm stets über der Abnahme bei 730nm liegt, bedingt durch verschiedene Anfangsgeschwindigkeiten bzw. durch Intermediate, die hier zu 10% P_x bei saturierend HR-Licht angesetzt sind. Aus vier Versuchen mit 100% saturierender HR-Einstrahlung ergibt sich eine Revertierungsrate von 55% $\pm$ 10%. Wenn man damit in die Rechnung geht, ergibt sich für die drei experimentell bestimmten Fälle:

a) 100% Sättigung

55% von 65% P_{fr} revertieren zu	36% P_r
100% von 10% P_x revertieren zu	10% P_r
im photostationären Gleichgewicht	25% P_r
Summe	71% P_r

b) 50% Sättigung

55% von 32% P_{fr} revertieren zu	18% P_r
100% von 5% P_x revertieren zu	5% P_r
im photostationären Gleichgewicht	63% P_r
Summe	86% P_r

c) 25% Sättigung

55% von 16% P_{fr} revertieren zu	9% P_r
100% von 3% P_x revertieren zu	3% P_r
im photostationären Gleichgewicht	81% P_r
Summe	93% P_r

Man sieht, daß die Übereinstimmung zu Tab.11) gut ist. Die im Tabellenanhang angegebenen kinetischen Daten sind rechnerisch auf den Endpunkt 100% Revertierung bezogen; für eine Umrechnung auf variable Endpunkte ist eine Kurzformel im Kapitel II, Punkt 9.3)abgeleitet. Für den hier vorgenommenen Vergleich der kinetischen Daten spielt die Wahl des Endpunkts keine Rolle, da auch bei einem falschen Endpunkt die Relationen gleichbleiben.

1.6) Kinetisches Verhalten mit Reduktionsmitteln

Ausgeklammert aus der Betrachtung blieb bis jetzt der bei Mumford und Jenner/1971 erstmalig beschriebene Einfluß von Reduktionsmitteln auf die Dunkelrelaxation. Sie beschreiben eine Beschleunigung der Dunkelkinetik mit NADH < FAD < FAD + NADH < $Na_2S_2O_4$ < red.Ferredoxin, wobei sie bei 10^{-6}M red. Ferredoxin den Spitzenwert von $k = 1{,}5 \times 10^{-3}$(1/sec.) finden. Sie beschreiben dies als katalytischen Effekt, da sie mit red.Ferredoxin, gemessen bei 425nm, keinen Verbrauch feststellen können. Weiterhin beschreiben sie einen Verlust an Phytochrom mit $Na_2S_2O_4$, der begleitet ist von der Ausbildung einer Schulter bei 580nm. Sie diskutieren meta Rb als intermediäre reduzierte Form (z.B. eine Isomerisierung über ein Radikalanion). In D_2O ist die Ausbildung des neuen Maximums bei 580nm auf weniger als ein Zehntel im Vergleich zu H_2O reduziert, was darauf schließen läßt, daß dieser Prozeß mit der Abstraktion eines Wasserstoffatoms verbunden ist.

Hier durchgeführte Potentialmessungen an Phytochrom erbrachten, daß zwischen P_r und P_{fr} kein Potentialunterschied besteht - mit und ohne Zusatz von Reduktionsmitteln - und daß auch während einer Dunkelperiode nach HR-Licht keine signifikanten Schwankungen auftreten. Lediglich bei -25°C wurde mit 1mM $Na_2S_2O_4$ (100facher Überschuß) in 30min. eine Potentialänderung von mind. 16mV gemessen (Tab.12). D.h., daß das Gesamtpotential keinen oder nur geringen Schwankungen unterliegt, aber evt. bei blockierter Phototransformation eine Reduktion, die intermediär eine Rolle spielt, sichtbar wird. Kufer und Scheer/1979 stellten fest, daß Phycocyanin und Allophycocyanin durch Behandlung mit Reduktionsmittel ($Na_2S_2O_4$) zwischen Ring B und C reduziert werden zu Rubinen mit Maxima bei 420nm. Hier durchgeführte Vorversuche mit denaturiertem Phytochrom erbrachten, daß Reduktionsmittel allgemein zwischen Ring B und C angreifen und Rubine ausbilden (z.B.: Ameisensäure, Na_2SO_3, Glutaraldehyd und $Na_2S_2O_4$). Versuche mit nativem Phytochrom und $Na_2S_2O_4$ erbrachten dasselbe Ergebnis sowohl mit P_r als auch mit P_{fr}.[5] Im Unterschied zu denaturiertem Phytochrom ist die Absorption bei 420nm im nativen Pigment nur ein kleines Maximum. Ein quantitativer Vergleich dieser Messungen mit dem Effekt von red.Ferredoxin auf Phytochrom ist zwar nicht direkt möglich, aber eine Abnahme der Extinktion bei 425nm und eine Zunahme bei 420nm von Phytochrom könnten sich auch gegenseitig kompensieren, speziell wenn der Verbrauch an Reduktionsmittel nur gering ist. Die von Mumford und Jenner/1971 beschriebene katalytische Wirkung von Reduktionsmitteln ist deshalb fraglich.

---

5) Diese Experimente wurden zusammen mit Dr.Kufer und Dr. Scheer durchgeführt und erstmals 1979 publiziert: Kufer, W. T.Brandlmeier und H.Scheer: Phytochrome and phycobiliproteins with chemically modified chromophores. In: Book of abstracts. Photoreceptors and plant development. p.11, Antwerpen July 1979.

Tab.12) Potentialmessungen an Phytochrom mit und ohne Reduktionsmittel bei vollständiger (4°C) und unvollständiger (-25°C) Phototransformation.

	P_r-Bezugswert (mV)	P_{fr} (mV)	P_r (mV)	P_{fr} (mV)	P_{fr} nach 30 min. (mV)	P_r (mV)
a) 4°C/Puffer/ pH 7,0	-150	-147	-146	-148	-154	-154
b) 4°C/Puffer/ pH 7,0 2mM $Na_2S_2O_4$ (≙ 100facher Überschuß)	-150	-150	-	-	-152	-153
c) -25°C/pH 8,0/ Puffer + Glycerin (1:1, v:v)	-150	-144	-	-	-136	-152
d) -25°C/pH 8,0/ Puffer + Glycerin (1:1, v:v)/1mM $Na_2S_2O_4$ (≙100facher Überschuß)	-150	-144	-	-	-120	-135
e) Differenz: d) minus c)	0	0	-	-	16	17

weitere Vorversuche mit Reduktionsmitteln (Na_2SO_3, NADH, $NaBH_4$, $Na_2S_2O_4$, Glutaraldehyd) erbrachten, daß bei Konzentrationen an Reduktionsmittel, wo eine Beschleunigung der Relaxationsprozesse sichtbar wird, stets das Spektrum stärker ausbleicht als bei HR-Belichtung ohne Reduktionsmittel, und daß dieser Ausbleicheffekt im Dunkeln nicht vollständig reversibel ist. D.h., daß das Spektrum insgesamt nicht mehr definiert ist und somit eine kinetische Auswertung wie in den vorhergehenden Punkten nicht möglich ist.[6] Weiterhin zeigte sich auch hier wieder - wie schon bei Mumford und Jenner/1971 - daß die Wirksamkeit eines Reduktionsmittels nicht konform geht mit dem jeweiligen Redoxpotential, sondern offenbar weitere Bedingungen in der Chemie des verwendeten Reduktionsmittels eine Rolle spielen, um hier als guter Katalysator oder Donor von Reduktionsäquivalenten wirksam zu werden. Neben $Na_2S_2O_4$ zeigte auch Glutaraldehyd (sowie $NaBH_4$ nach 14tägigem Stehen) eine Schulter bei 580nm, so daß dies kein ausschließlich auf $Na_2S_2O_4$ beschränkter Effekt zu sein scheint, sondern - wie auch bei 420nm - je nach Substanz verschieden stark ausgeprägt. Da $Na_2S_2O_4$ einerseits sehr effektiv wirkt, andererseits auch sehr schonend ist und außerdem in verdünnter Lösung sich binnen 24h zersetzt, wurde die folgende detaillierte Analyse mit $Na_2S_2O_4$ durchgeführt.

Um eine geeignete Konzentration an $Na_2S_2O_4$ zu ermitteln, wurde zunächst die Wirkung verschiedener Konzentrationen getestet (Tab.13). Als Index für die Wirkung von $Na_2S_2O_4$ wurde der Ausbleicheffekt auf zwei charakteristische Wellenlängen herangezogen, auf 665nm, wo sich der reine Ausbleicheffekt bemerkbar macht, und auf 580nm, wo sich die chemische Modifikation durch $Na_2S_2O_4$ durch ein neues Maximum bemerkbar macht. Während bei 0,5mM $Na_2S_2O_4$ der Bleicheffekt in etwa der gleiche ist wie ohne Reduktionsmittel überwiegt der Bleicheffekt bei 50mM $Na_2S_2O_4$ (-40% bei $P_r$max) die Wirkung bei 580nm (+15%). Bei 5mM $Na_2S_2O_4$ dagegen ist der Ausbleicheffekt bei 665nm und die Ausbildung des Maximums bei 580nm ausgewogen, so daß diese Konzentration für die serienmäßige Untersuchung herangezogen wird.

---

6) D.h. auch, daß die in der Literatur verschiedentlich zu findenden kinetischen Daten mit Reduktionsmitteln streng genommen unsinnig sind.

Tab.13) Änderung im P_r-Spektrum nach saturierend HR-Licht und Rückbelichtung mit DR-Licht nach einer Dunkelperiode von 15min. (4°C/Pufferlsg./pH 7,0) in Abhängigkeit von der $Na_2S_2O_4$-Konzentration.

Molarität von $Na_2S_2O_4$	665nm	580nm	Anmerkung	Überschuß an $Na_2S_2O_4$
0,5mM	90%	90%	normaler Bleicheffekt ≙ ohne Reduktionsmittel	100x
5mM	80%	120%	Gleichgewicht zwischen 580 und 665nm	1000x
50mM	60%	115%	Bleicheffekt dominant	10000x

Wie die Tabellen 14) und 15) zeigen ist das kinetische Verhalten unter Einfluß von Reduktionsmittel deutlich pH-abhängig, wobei allgemein die Veränderung der spektralen Eigenschaften im Basischen (pH 8) am schwächsten ausgeprägt ist und im Neutralen (pH 7) und im Sauren (pH 6) am stärksten. Insgesamt treten sieben verschiedene Effekte auf (s.dazu Abb. 35).

1) Bei 420nm bildet sich ein kleines Maximum aus, das durch HR- und Weißlicht verstärkt wird. Wenn man auf der Flanke bei 436nm (ca. 30 W/m^2) belichtet zeigt sich eine der DR-Belichtung entsprechende Wirkung (Zunahme der Extinktion bei 665nm, Abnahme bei 730nm), wobei ca. 2min. bei 436nm 1min. bei 728 nm (31 W/m^2) entsprechen. Ohne $Na_2S_2O_4$ benötigt man ca. 5min. bei 436nm um dieselbe Wirkung zu erzielen. Wie aus Tab.15) ersichtlich stimmt auch die Tendenz des kinetischen Verhaltens bei 420, 730 und 698nm vielfach überein. Wenn sich $Na_2S_2O_4$ zersetzt hat oder durch Dialyse entfernt wird, verschwindet diese Absorption bei 420nm wieder.

2) Bei 560nm bildet sich eine geringfügige Schulter aus, sobald genügend $Na_2S_2O_4$ vorhanden ist (ab 5mM). Diese Schulter wird unter Einfluß von HR- und Weißlicht zu einem neuen Hauptmaximum in einer raschen Kinetik. Diese Kinetik tritt nur auf,

35a)

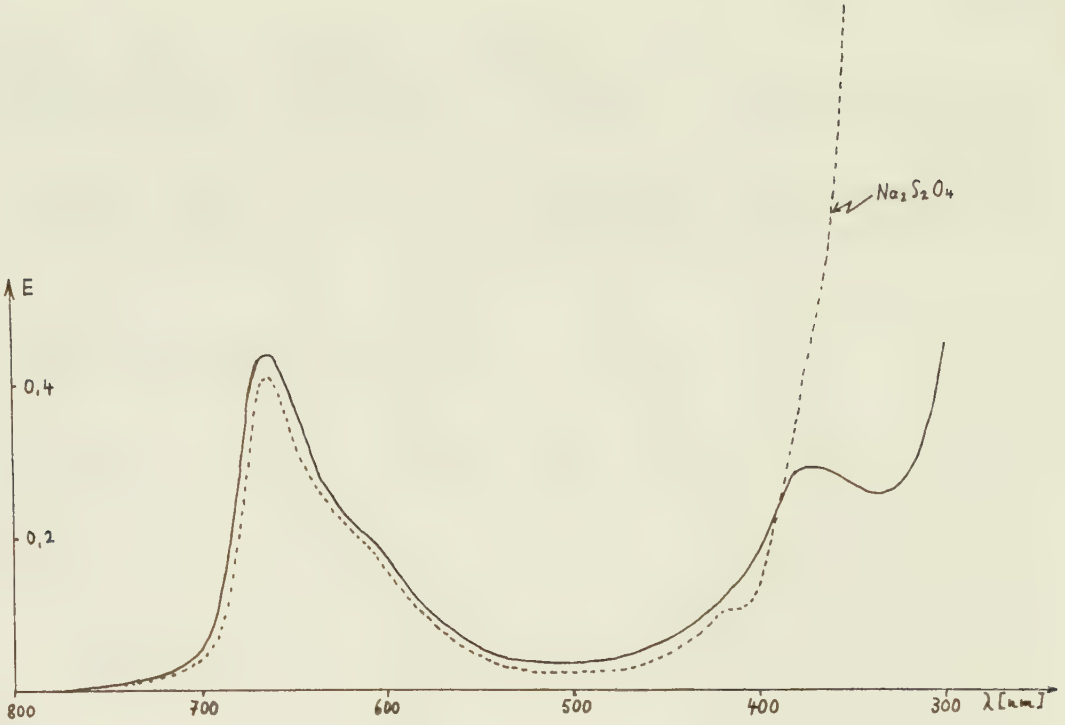
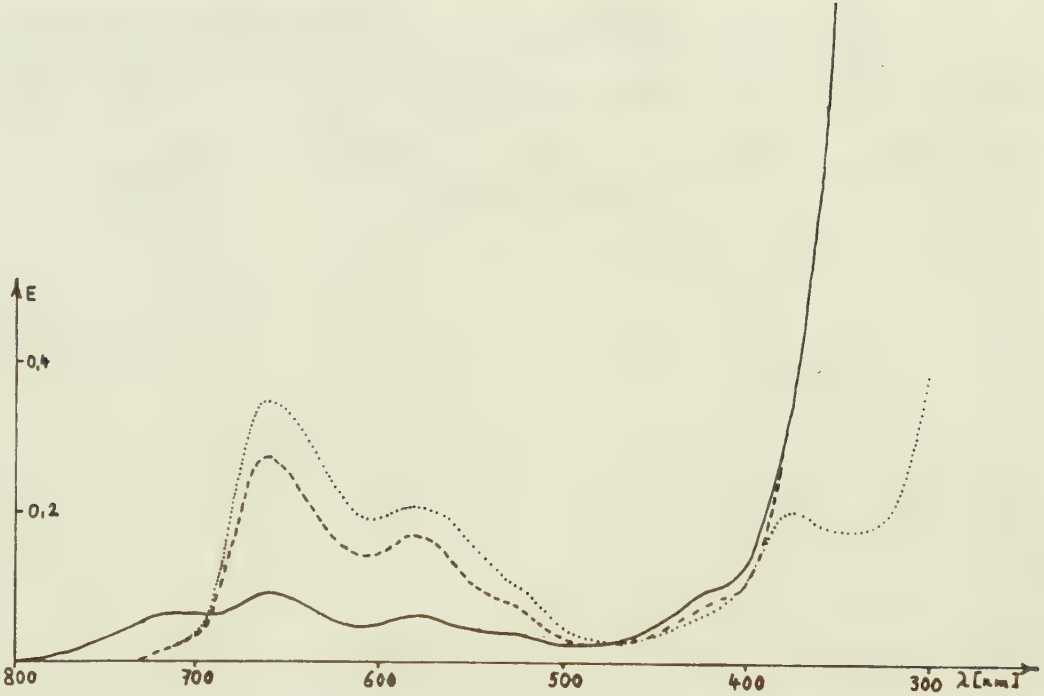


Abb.35) Einfluß von 5mM $Na_2S_2O_4$ auf Absorptionsspektren von niedermolekularem Phytochrom in Puffer/pH 7,0 (bei 4°C);
a) gerade Linie: P_r; gestrichelt: P_r + 5mM $Na_2S_2O_4$.

35b)



b) gerade Linie: P_{fr} nach 3mal saturierend HR-Licht; gestrichelt: sättigend zurückbelichtet zum P_r; gepunktet: P_r nach 24h.

Tab.14) Ausbleicheffekt in Abhängigkeit von Reduktionsmittel und Art der Belichtung nach Rückbelichtung zum P_r bezogen auf Ausgangswert P_r-Spektrum = 100%.

Molarität von $Na_2S_2O_4$	Art der Belichtung (+ Dunkelperiode)	665nm	580nm	540nm	420nm	Lösungsmittel/pH-Wert/ Temperatur
5mM	2 x sat.HR	80%	120%	-	-	Puffer/pH 6/4°C
5mM	sat.HR	80%	120%	-	-	Puffer/pH 7/4°C
	2 x sat.HR	60%	120%	-	-	
	5 x sat.HR	40%	120%	-	-	
	5 x sat.HR + 24h dunkel	70%	180%	-	-	
50mM	20h HR	5%	200%	150%	200%	
	25h Weißlicht	0%	30%	20%	15%	
5mM	2 x sat.HR	90%	90%	-	-	Puffer/pH 8/4°C
5mM	2 x sat.HR	80%	130%	-	-	Puffer + Glycerin(1:1,v:v) pH 6/4°C
5mM	2 x sat.HR	80%	80%	-	-	Puffer + Glycerin(1:1,v:v) pH 8/4°C
5mM	2 x sat.HR	80%	130%	-	-	Puffer + Glycerin(1:1,v:v) pH 6/-10°C
5mM	2 x sat.HR	80%	100%	-	-	Puffer + Glycerin(1:1,v:v) pH 8/-10°C

Tab.15) Veränderung in (mE) nach saturierend HR-Licht und einer Dunkelperiode von 15min. bezogen auf $\Delta(\Delta E) = 500mE$ bei 5mM $Na_2S_2O_4$; (1 : 1) = Puffer + Glycerin(1 : 1, v : v).

Wellenlänge	Puffer/ 4°C/pH 6	Puffer/ 4°C/pH 7	Puffer/ 4°C/pH 8	(1 : 1)/ 4°C/pH 6	(1 : 1)/ 4°C/pH 8	(1 : 1)/ -10°C/pH 6	(1 : 1)/ -10°C/pH 8
420nm	-36 (ca. 6min. oszillierend)	-20	-16	-34	-10	konstant	konstant
580nm	+35 (ca. 10min. oszillierend)	+50	+14	+31	+4	+15	konstant
665nm	+80	+117	+82	+79	+66	+41	+39
730nm	-60	-56	-40	-72 (ca. 20sec. Anstieg)	-56 (ca. 40sec. Anstieg)	-6 (ca. 50sec. Anstieg: +12)	ca. 4min. Anstieg: +66, dann konstant
698nm	-67	-39	-18	-69 (ca. 20sec. Anstieg)	-25 (ca. 40sec. Anstieg)	-13 (ca. 30sec. Anstieg: +6)	ca. 6min. Anstieg: +14, dann konstant
615nm	+36 (ca. 6min. oszillierend)	-	-	-	-	-	-

wenn P_r in P_{fr} transformiert wird. Primär wird die Schulter von P_r bei ca. 615nm gelöscht. Die weitere Zunahme bei 580nm geht konform mit einer Abnahme der Absorption bei 665nm (bzw. auch bei 730nm). Belichtung bei 578nm (ca. 80 W/m^2) zeigt HR-Wirkung (Zunahme der Extinktion bei 730nm und Abnahme bei 665nm). Im Unterschied zur Absorption bei 420nm ist hier aber keine zusätzliche Sensibilisierung festzustellen. Mit und ohne $Na_2S_2O_4$ entspricht ca. 1min. bei 578nm 1min. bei 660nm (64 W/m^2). Nach Zersetzung von $Na_2S_2O_4$ bzw. Dialyse bleibt das Maximum bei 580nm erhalten. Die Ausbildung dieses Maximums ist stark pH-abhängig. Im Alkalischen (pH 8) bildet sich das Maximum bei 580nm fast gar nicht aus. Im Neutralen sind die Bedingungen optimal. Im Sauren (pH 6) tritt eine anfängliche Oszillation auf, die auch bei 420 und 615nm zu beobachten ist (Abb. 36). Da die Ausbildung der Absorption bei 580nm primär die Schulter bei 615nm löscht, ist anzunehmen, daß hier der Chromophor in reduzierter Form (420, 580nm) in einer Konkurrenz mit dem normalen Chromophor (615, 665, 725nm) steht.[7] Zudem sind diese Oszillationen ein weiterer Hinweis auf mögliche Oszillatoreigenschaften von Phytochrom.

3) Bei Ausbildung eines Maximums bei 580nm tritt bei 540nm eine Schulter auf, die sich ähnlich verhält wie die Absorption bei 580nm. Ob es sich dabei um eine eigenständige spektrale Form handelt, läßt sich aufgrund der minimalen Absorption nicht sagen.

4) Das Spektrum bleicht insgesamt stark aus, lediglich 580nm nimmt rasch zu, 420 und 540nm werden bei längerer Belichtung ebenfalls verstärkt gebildet. Dieser Ausbleicheffekt gilt für das Spektrum in seinen beiden Formen, jedoch ist das P_{fr}-Spektrum gegenüber dem P_r-Spektrum stärker gebleicht; die Absorption bei $P_{fr}max$ beträgt ca. 1/3 P_rmax.

5) Belichtet man das System nach saturierend HR-Licht zurück zum P_r und läßt das System 24h im Dunkeln stehen, zeigt sich der Ausbleicheffekt als reversibel bis auf die bei 580nm ge-

---

7) Detaillierter müßte man diese Übergänge in der CD-Spektroskopie sehen können.

8) Vgl. auch Guthoff/1978, wo $\Delta(\Delta E)$-Oszillationen an Rohextrakten mit 10mM Na_2SO_3 gefunden wurden.

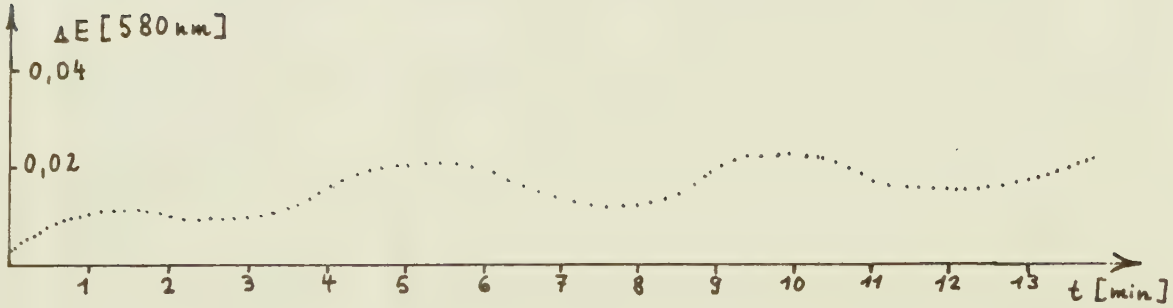


Abb.36) Oszillierende Dunkelkinetik bei 580nm in Pufferlsg./pH 6,0/4°C in Anwesenheit von 5mM $Na_2S_2O_4$ direkt nach saturierend HR-Licht; ΔE_{580} ist bezogen auf ein Ausgangsspektrum mit $P_r max$ = 500mE.

bildete neue Absorption. Mit zunehmender HR-Dosis und zunehmender Verweildauer des Systems in der HR-belichteten Form nimmt die Reversibilität des Ausbleicheffekts im Dunkeln ab, d.h. Phytochrom wird dabei irreversibel zerstört, bzw. in reduzierte Form überführt. Es wird offenbar bei der HR-Belichtung eine photogebleichte Form erzeugt, die bis zu einer gewissen Sättigung (ca. 20% des Gesamtphytochroms) stabil und im Dunkeln reversibel ist.

6) Säuert man das System nach Rückbelichtung mit DR-Licht vorsichtig auf pH ca. 3,0 an, verschiebt sich die Absorption bei 580nm nach 615nm, also genau in die Position, die die Schulter des normalen Spektrums hat. Gleichzeitig verschiebt sich die Absorption bei 420nm nach 430nm. Belichtet man jetzt nochmals mit HR-Licht, bleicht das System aus, nur die Extinktion bei 430nm steigt an.

Säuert man das System nach HR-Licht an, verschiebt sich lediglich 420nm nach 430nm. Die Absorption bei 580nm scheint somit ein Produkt zu sein, das chemisch der P_r-Form nahesteht. Durch eine Protonierung läßt sich diese Absorption nach DR-Licht in die Schulter des P_r-Maximums verwandeln. Dies würde auch erklären, weshalb bei pH 6 nach HR-Licht die Bildung der Absorption bei 580nm in Konkurrenz mit der Absorption bei 615 nm steht. Weiter ist aufgrund dieser Befunde die Frage offen, ob die Schulter von P_r bei 615nm ein zweiter Übergang ist (Song et al./1979) oder ob es sich um eine Art P_r' handelt. Grombein/1976 hat beim denaturierten P_r-Chromophor im Basischen eine Schulter bei 580nm, im Sauren bei 630nm beobachtet.

Im Alkalischen bleibt die Absorption bei 580nm erwartungsgemäß erhalten; ab pH 8,5 bildet sich ein neues Maximum bei 370nm aus. Unter dem Einfluß von Licht bleicht das System aus bis auf 580, 540 und 370nm. D.h. 370nm scheint die anionische Form von 420/430nm zu sein.

7) Beim Versuch der Ruckoxidation mit 1 x 10^{-4}M $K_3(Fe(CN)_6)$ bleicht das gesamte Spektrum aus, nur 580 und 540nm bleiben erhalten. Wenn man Phytochrom direkt oxidiert, erhalt man ebenfalls eine Absorption bei 580nm. Diese Absorption kommt zustande durch eine Anlagerung zwischen Ring A und B des Chromophors, so daß das verkürzte Chromophorsystem der Ringe B, C und D nur noch bei 580nm absorbiert. Während die Anlagerung zwischen Ring C und D, die die Absorption bei 420nm verursacht,offenbar

spezifisch auf reduzierende Agentien beschränkt ist, könnte die oxidative Ausbildung eines Maximums bei 580nm auch durch geeignete Reduktionsmittel katalysierbar sein (z.B. über eine Umpolung), da dies auch bei den Chromopeptiden von P_r und P_{fr} gefunden wurde (s.Kapitel III, Punkt 2.2). Im Unterschied zu Oxidationsmitteln, die prinzipiell zur Zerstörung des Pigments führen, gilt für $Na_2S_2O_4$, daß es nur an einer ganz bestimmten Stelle der Transformation von P_r nach P_{fr} und relativ schonend angreift. Dabei wird die intermediär offenbar wenig geschützte Position zwischen Ring A und B über einen noch unbekannten Mechanismus mit einem "falschen Substrat" blockiert, sei es durch eine katalysierte Oxidation (s.o.) oder durch eine Reaktion in der nächsten Umgebung (z.B. an einer benachbarten Aminosäure). Jedenfalls ist dies ein weiterer Beweis dafür, daß bei der Phototransformation eine Umwandlung zwischen Ring A und B stattfindet (vgl. Grombein et al./1975).

1.7) Anmerkungen zum Mechanismus der Phototransformation

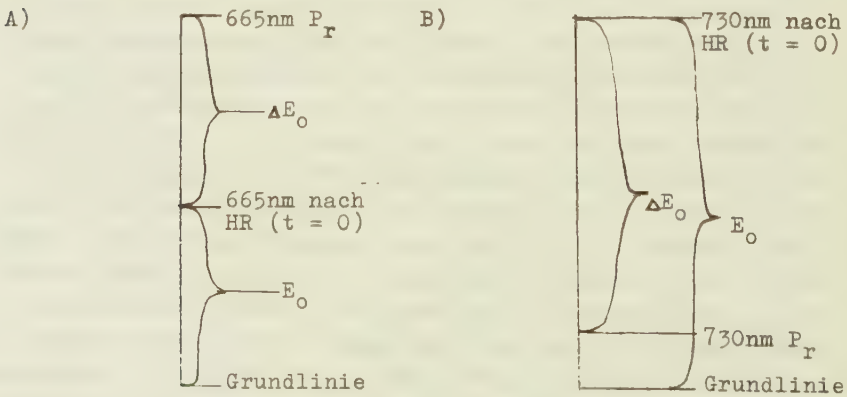
Für die beschleunigende Wirkung von Reduktionsmitteln auf die Relaxation von P_{fr} nach P_r bieten sich also mindestens drei Intermediate als Kandidaten an: 420nm, 580nm, sowie eine stark photogebleichte Form. 420nm erscheint dabei aus mechanistischen Gründen sehr unwahrscheinlich; ob einer Reaktion zwischen Ring B und C wirklich eine Bedeutung als Intermediat zukommt wie bei Kufer/1980 vorgeschlagen oder ob es ein reines Artefakt ist, ist in der Tat fraglich. Die Versuche mit $NaBH_4$ sprechen stark dagegen: Die mit $NaBH_4$ erfolgende irreversible Reaktion zwischen Ring B und C ist minimal, die Beschleunigung der Kinetik aber stark ausgeprägt.
Bei 580nm hingegen findet spezifisch während der Umwandlung von P_r nach P_{fr} eine Reaktion mit Reduktionsmittel statt. Bei einfach saturierender HR-Belichtung ist dies quantitativ geringfügig, während die beschleunigte Dunkelrelaxation dominiert. Es liegt die Vermutung nahe, daß das Reduktionsmittel, das unter den milden Bedingungen der Rückreaktion (Dunkelrelaxation) beschleunigend wirkt, unter photochemischen Bedingungen in der Vorwärtsreaktion irreversibel reagiert.

Hilfreich ist hier der Vergleich mit den Chromopeptiden von P_r und P_{fr} (vgl. Kapitel III, Punkt 2.2), wo sowohl mit Reduktionsmittel wie auch mit Oxidationsmittel eine Umwandlung vom P_{fr}-Peptid (610nm als Peptid-Kation!) ins P_r-Peptid erfolgt. Dabei kann man die Menge an Reduktionsmittel so gering halten, daß zwischen Ring B und C (420nm) keine Anlagerung erfolgt, während die Verwendung von Oxidationsmittel neben der Umwandlung zum P_r-Peptid ein Oxidationsprodukt zwischen Ring A und B bei 600nm (in saurem Milieu!) liefert.

Andererseits wird bei der Verwendung von Reduktionsmitteln in verstärktem Maße das Phänomen einer photogebleichten Form gefunden. Diese konnte in den vorhergehenden Punkten mit einer Absorption bei 580nm (meta Rb) in Verbindung gebracht werden. Es wäre denkbar, daß das hier beobachtete Intermediat bei 580nm eine durch die irreversible Reaktion mit Reduktionsmittel blockierte und modifizierte (u.a. nicht mehr photogebleicht) Form von meta Rb ist, wobei der Absorptionsspielraum dieser Spezies zwischen 540nm und 615nm (protonierte Form, vgl.auch: P_{fr}-Kation) liegt. Da sich in D_2O die reduktive Ausbildung der Absorption bei 580nm extrem verlangsamt (Lumford und Jenner/1971) und hier gefunden wurde, daß die 580nm-Absorption aus einer 615nm-Absorption primär entsteht, könnte man die Folge meta Ra - meta Rb - P_{fr} aufteilen in: meta Ra - meta Rb-H - meta $Rb^{\oplus}$ - $P_{fr}^{\oplus}$. Dies würde das verschiedentlich vorgeschlagene $P_{fr}H$ (Anderson et al./1969, Borthwick et al./1969) mit dem von Rüdiger/1972b vorgeschlagenen $P_{fr}^{\oplus}$ in einen sinnvollen Kontext bringen. Weiterhin würde dies eine Hypothese über das P_{fr}-Kation (620nm) und das kationische P_{fr}-Chromopeptid (610nm) ermöglichen, nämlich daß man unter Ausschaltung des Proteins nur noch den meta Rb-H Chromophor sieht. Oder: P_{fr} = meta $Rb^{\oplus}$ + Apoprotein. Ein solcher Bezug zum relativen Protonierungs- oder Deprotonierungsgrad des Apoproteins könnte evt. auch die pH-Abhängigkeit der Kinetiken erklären.

2) Rückwirkung auf die Spektraldaten von Phytochrom

Durch die Wahl des Meßprinzips auf Basis der Extinktionsdifferenzen ist die Auswertung der Kinetiken unabhängig von den absoluten Spektraldaten. Im Folgenden werden die kinetischen Daten zusammen mit den aus den Spektren sich ergebenden Absolutwerten bei 665 und 730nm in der P_r- und der P_{fr}-Form betrachtet. Die Analyse dieser beiden exemplarischen Wellenlängen zeigt, daß sowohl die genaue Bestimmung von Phytochrom als $\Delta(\Delta E)$ wie auch die Erstellung von exakten Spektren die kinetischen Verhältnisse berücksichtigen muß. Dafür seien zunächst einige Größen definiert: 1) Die Extinktionsdifferenz zur Zeit t = 0, die sich zusammensetzt aus den rechnerischen Extinktionsdifferenzen der langsamen und der schnellen Komponente zur Zeit t = 0 nach saturierend HR-Licht und 2) Die Extinktion des jeweils zugehörigen P_r-Kontrollwerts über der Grundlinie. Aus 1) und 2) läßt sich die Extinktion E_o von P_{fr} im photostationären Gleichgewicht zur Zeit t = 0 ermitteln; so ergibt sich für 665 und 730nm folgendes Bild:



Schema 6) Spektrale Größen für P_r und P_{fr} (zur Zeit t = 0 nach saturierend HR-Licht) bei 665nm (A) und 730nm (B).

Daraus läßt sich der Faktor ($\Delta E_o/E_o$) x 100% bilden, der für eine vollständige Reversion zum P_r die Zunahme oder Abnahme der Extinktion in % von P_{fr} zur Zeit t = 0 angibt. Dasselbe Verhältnis läßt sich auch für die langsame Komponente allein bilden: (ΔE_olangs./E_o) x 100%; die Differenz zum ersten Faktor entspricht dann der schnellen Komponente. So ergeben sich z.B. bei 4°C/Pufferlsg. für den pH-Bereich 6 bis 8 für das photostationäre Gleichgewicht nach HR- bzw. DR-Licht die in Tab.16) zusammengestellten Spektraldaten.

Tab.16) Spektraldaten bezogen auf das photostationäre Gleichgewicht in Pufferlsg./4°C/pH 6 - 8 (Mittelwerte). Zweite Spalte: langsame + schnelle Komponente; dritte Spalte: langsame Komponente allein.
1) Gemäß Schema A); 2) Gemäß Schema B).

Wellenlänge (nm)	($\Delta E_o/E_o$)100%	(ΔE_olangs./E_o)100%
665[1)]	108	99
698[2)]	62	59
710[2)]	77	73
730[2)]	92	87

Für die Aufzeichnung von Spektren ergibt sich a) daß das P_r-Spektrum gemäß Punkt 1.3) mit Phytochrom aufgezeichnet werden muß, das keine Intermediate durch vorhergehende HR-Belichtung oder durch HR-Falschlicht enthält und b) daß das P_{fr}-Spektrum zeitlich definiert sein muß, also entweder zur Zeit t = 0 nach saturierend HR-Licht definierter Wellenlänge und Intensität (photostationäres Gleichgewicht) oder zu einem kinetisch definierten Zeitpunkt danach. Für die allgemein übliche Praxis zur Aufzeichnung von Spektren kann man etwa folgende Annahmen machen: Bei einer Schreibergeschwindigkeit von 60nm/min. wird das Spektrum von 800nm zu kürzerer Wellenlänge hin gefahren, so daß z.B. bis zum Maximum von 665nm 135sec. vergehen, zuzüglich 5sec. vom Ende der Belichtung bis zum Be-

ginn der Messung; es ergeben sich also ca. 140sec. Eine rechnerische Abschätzung, was eine Zeit von 140sec. ausmacht für die Messung, sieht folgendermaßen aus.

Fall α) Für 4°C, pH 7 wurden in Pufferlsg. bei 665nm folgende kinetische Daten ermittelt.

k_l = -0,0000853 (1/sec.)

% langsame Komponente = 91

k_s = -0,0149 (1/sec.) (Mittelwert)

% schnelle Komponente = 9

(Das negative Vorzeichen der Geschwindigkeitskonstanten k_l und k_s ist hier deshalb notwendig, weil sich die ganze Rechnung auf die Extinktionsdifferenz bezieht, die sich natürlich bei der Relaxation verringert).

Für die langsame Komponente ist ΔE zur Zeit t = 140sec. auf y% reduziert:

$y\% = 100\% \times e^{k_l \times 140sec.} = 98,8\%$,

d.h. die Extinktionsdifferenz bei 665nm ist auf die langsame Komponente bezogen um 1,2% zu klein.

Dieselbe Rechnung für die schnelle Komponente ergibt:

$y\% = 100\% \times e^{k_s \times 140sec.} = 18,4\%$,

d.h. eine bezüglich der schnellen Komponente um 81,6% zu kleine Extinktionsdifferenz.

Wenn man diese beiden Werte auf den %Anteil der schnellen und langsamen Komponente an der Gesamtkinetik reduziert, ergibt sich:

$\frac{1,2 \times 91}{100}\ \% = 1,1\%$;

$\frac{81,6 \times 9}{100}\ \% = 7,3\%$;

d.h. die Extinktionsdifferenz ist bei 665nm unter den gegebenen Bedingungen um ca. 8,5% kleiner als zur Zeit t = 0 im photostationären Gleichgewicht.

Dasselbe Ergebnis erhält man, wenn man die Daten auf den Endpunkt der Dunkelrelaxation bei 70% P_r gemäß Punkt 1.5) bezieht. Bei einem Endpunkt von 70% P_r bzw. 100% saturierender

HR-Belichtung repräsentieren die spektralen Extinktionsdifferenzen 75% des Gesamtphytochroms (25% bleiben ja in der P_r-Form). Dabei kann eine Revertierungsrate von 55% (P_{fr}) und 100% (P_x) angesetzt werden. Der Anteil P_x beträgt ca. 10% des Gesamtphytochroms und bleicht ca. 10% der P_r-Extinktion aus (vgl.Kapitel IV), Punkt 1.3 und 1.5), muß also für die Extinktionsdifferenz bei 665nm zu etwa 20% angesetzt werden, da die Extinktionsdifferenz bei 665nm etwa die Hälfte von $E_{P_r/665}$ beträgt. Die verbleibenden 80% gehen auf P_{fr} zurück, das zu 55% revertiert, also ca. 45%. Der Endpunkt ergibt sich damit zu 20% + 45% = 65%. Wenn man in die Umrechnungsformel für die Geschwindigkeitskonstanten (Kapitel II, Punkt 9.3) als rechnerischen Endpunkt 65% einsetzt, ergibt sich für die langsame Komponente:
$k_1' = 0{,}0001295$ (1/sec.); $y' = 98{,}2\%$;
Ferner zerfällen sich diese 65% wiederum in die langsame und die schnelle Komponente. Die schnelle Komponente bleibt, da sie innerhalb des Meßzeitraums vollständig abläuft, in ihrer so ermittelten absoluten Größe erhalten, beträgt also 9%, so daß der Rest der langsamen Komponente entspricht = 56%. Damit ergeben sich die neuen Werte:

$\frac{1{,}8 \times 56}{100}\ \% = 1{,}0\%$;

$\frac{81{,}6 \times 9}{100}\ \% = 7{,}3\%$;

Also ebenfalls eine Abweichung der Extinktionsdifferenz bei 665nm um ca. 8,5%!

Fall ß) Dieselbe Rechnung analog für 730nm durchgeführt ergibt eine um ca. 4,5% kleinere Extinktionsdifferenz zur Zeit t = 140sec. nach saturierend HR-Licht.

Für den Fall größerer Zeitintervalle zwischen Belichtung und Messung läßt sich nach 5min. ein Grenzwert mit ca. 11,5% Abweichung der Extinktionsdifferenz bei 665nm und ca. 6% bei 730nm errechnen.

Die Ergebnisse der Rechnung bei 665nm nach einem Intervall von 140sec., wie sie exemplarisch unter Fall α) vorgeführt wurde, liefern, angewandt auf die Faktoren $(\Delta E_o/E_o)100\%$, die Vergleichsfaktoren $(\Delta E_{140''}/E_{140''})100\%$.

Wenn sich ΔE_o um α % verringert, gilt:

$$\Delta E_{140"} = \frac{\Delta E_o (100 - \alpha)}{100} ;$$

um denselben Betrag vergrößert sich E_o,

also: $E_{140"} = E_o + \frac{\Delta E_o \times \alpha}{100}$;

und für das Verhältnis $\Delta E_{140"}/E_{140"}$ gilt:

$$\frac{\frac{\Delta E_o (100 - \alpha)}{100}}{E_o + \frac{\Delta E_o \times \alpha}{100}} = \frac{\Delta E_o (100 - \alpha)}{100 \times E_o + \Delta E_o \times \alpha} ;$$

nun gilt: $(\Delta E_o/E_o)100\% = z\%$;

wenn man $E_o = 1$ setzt, muß $\Delta E_o = z/100$ sein;

damit vereinfacht sich $\Delta E_{140"}/E_{140"}$ zu:

$$\frac{\frac{z}{100} (100 - \alpha)}{100 + \frac{z}{100} \times \alpha} ;$$

Für pH 7/4°C hat sich bei 665nm in Pufferlsg. ergeben:

$\alpha = 8,5\%$

$z = 108\%$

also: $(\Delta E_{140"}/E_{140"})100 = \left(\frac{1,08 \times 91,5}{100 + 1,08 \times 8,5} \right) 100\% = 91\%$;

Dieselbe Rechnung für den Endpunkt von 70% P_r durchgeführt ergibt mit $\alpha = 8,5\%$ und $z = 70\%$:

$$(\Delta E_{140"}/E_{140"})100 = \left(\frac{0,7 \times 91,5}{100 + 0,7 \times 8,5} \right) 100\% = 60\%;$$

Die Analyse der Spektraldaten aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit ist in den Tabellen 63 bis 69) des Anhangs zusammengefaßt. Aus dem Vergleich von Tabelle 63) und 64) ist deutlich zu sehen, daß in glycerinhaltiger Lösung die Entfaltung des Spektrums selbst merklich beeinträchtigt ist. Eine Temperatur- und pH-Abhängigkeit scheint, solange die vollständige Phototransformation möglich ist, hierbei keine besondere Rolle zu spielen.

Für die Bestimmung von $\Delta(\Delta E)$ ergibt sich folgendes Kalkül:

Es gilt $\Delta(\Delta E_o) = (E_{660} - E_{730})_{730} - (E_{o660} - E_{o730})_{660}$ und

$$\Delta(\Delta E)' = (E_{660} - E_{730})_{730} - ((E_{o660} + \frac{E_{o660} \times \alpha}{100}) - (E_{o730} - \frac{E_{o730} \times \beta}{100}))_{660},$$

wobei α und β den oben abgeleiteten Prozentzahlen unter Fall α) und β) entsprechen.

Ferner wird folgendermaßen substituiert:

$(E_{660} - E_{730})_{730} = l;$

$(E_{o660} - E_{o730})_{660} = m;$

$(E_{o660})_{660} = a;$

$(E_{o730})_{660} = b;$

$$\Delta(\Delta E)' = l - m - (\frac{a}{100} \times \alpha + \frac{b}{100} \times \beta)$$

$$\Delta(\Delta E)' - \Delta(\Delta E_o) = -(\frac{a}{100} \times \quad + \frac{b}{100} \times \beta) = \delta$$

$$\frac{100}{\beta} \times \delta = -\frac{\alpha}{\beta} \times a - b = -(\frac{\alpha}{\beta} + 1)a + a - b$$

$$\delta = \frac{-(\frac{\alpha}{\beta} + 1)a + m}{100/\beta}$$

$$\Delta(\Delta E)' = \Delta(\Delta E_o) + \delta = \Delta(\Delta E_o) + \frac{-(\frac{\alpha}{\beta} + 1)a + m}{100/\beta}$$

$$\Delta(\Delta E)' = \Delta(\Delta E_o) + \frac{(-\alpha + \beta)a}{100} + \frac{m \times \beta}{100}$$

$$\Delta(\Delta E)' = l - m + \frac{m \times \beta}{100} - \frac{(\alpha - \beta)a}{100}$$

$$\Delta(\Delta E)' \approx \Delta(\Delta E_o) - (\frac{\alpha - \beta}{100})(E_{o660})_{660};$$

(für kleines β)

Wird z.B. bei der $\Delta(\Delta E)$-Messung eine mittlere Meßzeit von nur 30sec. benötigt, errechnen sich immerhin bei $4^{\circ}C$/pH 7 in Pufferlsg. für α ca. 3,5% und für β ca. 1,5%; daraus ergibt sich:

$$\Delta(\Delta E)' = \Delta(\Delta E_o) - \frac{2}{100}(E_{o660})_{660}.$$

Die hier durchgeführten Rechnungen zeigen, daß alle auf Spektraldaten von Phytochrom quantitativ basierenden Rechnungen,

die bislang angestellt wurden und die alle den Einfluß der Dunkelrelaxation unberücksichtigt lassen - z.B. Butler et al./1964, Hartmann/1966 - , relativiert sind, da sie sich auf ein keineswegs definiertes Spektrum beziehen; vielmehr liegen alle diese Untersuchungen in einem Zwischenbereich zwischen dem photostationären Gleichgewicht (das gemäß Punkt 1.3 und 1.5 ebenfalls bislang nicht exakt bestimmt ist) und dem Dunkelgleichgewicht, wobei die Abweichungen nach 5min. bereits einen Wert von mehr als 10% der Extinktionsdifferenz bei 665nm erreichen.

3) Diskussion. Nachträge

Der Versuch verschiedene kinetische Anomalien in Spektren festzuhalten ist nicht gelungen, da diese relativ geringfügig sind, um noch in Spektren deutlich sichtbar zu sein. Lediglich der Sonderfall, daß sowohl bei 665 wie bei 730nm eine Zunahme der Extinktion auftritt, so daß das gesamte Spektrum zunimmt (z.B. bei $-10^{o}C$ oder mit $Na_2S_2O_4$) ist auch spektral sichtbar (vgl. Abb.35). Details sind jedoch nur in der kinetischen Analyse erfaßbar.
Wie bereits unter Punkt 1.2) erläutert, liegt bei einem pH-Wert von ca. 6 eine weitgehende Übereinstimmung der verschiedenen Kinetiken vor. Im Punkt 1.7) wurde die pH-Abhängigkeit des Systems dahingehend diskutiert, daß man eine Abhängigkeit der Dunkelrelaxation vom relativen Protonierungsgrad des Apoproteins (mit einer mehr oder weniger günstigen Faltung) annehmen muß. Denn die pH-Abhängigkeit ist aufgrund ihrer langsamen kinetischen Ausprägung kaum als spezifische Protonierung/Deprotonierung einer einzelnen Reaktion verständlich. Der pH-abhängige Verlauf der verschiedenen Kinetiken zeigt gleichzeitig bei pH o einen Wendepunkt. Dies ließe sich pauschal als pK-Wert der Dunkelrelaxation interpretieren oder genauer als pK-Wert für die günstigste Faltung des Apoproteins bezüglich der Dunkelrelaxation. (Falls das Apoprotein in verschiedenen Varianten vorliegt, ist an dieser Stelle ein Einfluß auf die Kinetik zu erwarten. Die gefundenen Werte repräsentieren aber in jedem Fall das summarische Verhalten). Wenn man Tab.70) zu Hilfe nimmt, zeigt sich, daß

in der Tat die Summe der Änderungen bei pH 6 am größten ist, bei pH 8 am geringsten. Weiterhin ist im Basischen aber die Bildung von P_r am stärksten beschleunigt. D.h. aber, daß im Basischen P_{fr} stabilisiert ist und Intermediate destabilisiert sind. Umgekehrt umgekehrt. Da es von P_{fr} weder im denaturierten Zustand noch als Chromopeptid stabile Anionen oder freie Basen gibt, sondern nur Kationen, ist dies ein weiterer eindrucksvoller Beleg für die physiologische Rolle des Apoproteins, was auch für die Annahme spricht, daß ein P_{fr} ohne Apoprotein, als Kation kurzzeitig stabilisiert, ein meta Rb-H Chromophor ist.

Untersuchungen an Phytochrom haben ergeben, daß in glycerinhaltigem Medium die in vivo-Eigenschaften von Phytochrom wesentlich besser simuliert werden als in wässriger Lösung (Baumé/1974, Boisard et al./1968, Boisard/1969, Kendrick/1974, Kendrick und Spruit/1974). Dies läßt sich korrellieren mit der Tatsache, daß Phytochrom in Membrannähe, also in relaxierender Umgebung, lokalisiert ist (Pratt und Coleman/1971, Rubinstein et al./1969) und höchstwahrscheinlich über eine Membranbindung wirkt (vgl.Kapitel I, Punkt 2), welche HR induziert ist, also auf P_{fr} zurückgeht. Kendrick und Spruit/1972 fanden, daß unter normalen Lichtbedingungen, nämlich Weißlicht, im Bereich um 730nm eine verstärkte Akkumulation festzustellen ist; dies umso mehr in glycerinhaltigem Medium. Wie in der Einleitung erwähnt, konnte in vivo nur für Dikotyledonen, nicht aber für Monokotyledonen eine Dunkelrelaxation nachgewiesen werden und selbst bei Dikotyledonen handelt es sich wegen der schnellen Destruktion nur um Beträge um die 10% (Furuya et al./1965). Wenn bei Monokotyledonen in vivo eine gleichzeitige Zunahme der Extinktion bei 665 und 730nm auftritt, wie sie hier in glycerinhaltigem Medium oder mit Reduktionsmittel gefunden wurde, bliebe die in vivo gemessene Differenz zwischen 665 und 730nm im wesentlichen unverändert; eine Dunkelrelaxation würde mithin nicht in Erscheinung treten. Dies könnte erklären, weshalb Monokotyledonen in vitro Dunkelrelaxation zeigen, in vivo aber nicht.

Eine weitere Spekulation über mögliche physiologische Äquivalente legt der Befund nahe, daß Phytochrom mit Reduktionsmitteln teilweise reagiert zu Produkten bei 420 und 580nm. Wenn solche Produkte auch physiologische Bedeutung haben, wäre manches Phänomen (wie z.B. die Hochenergiereaktion), das in das Schema von Phytochrom nicht recht passen will und mit dem Blaulichtrezeptor nicht zu erklären ist (vgl. Gressel/1979, Mancinelli/1980), auf das Verhalten bei der Kombination HR-Licht + Reduktionsmittel zu überprüfen.

V) ZUSAMMENFASSUNG

1) Es wird ein Verfahren zur Reinigung von Hafer-Phytochrom beschrieben, das elektrophoretisch reines Phytochrom mit MG = 60000 liefert.

2) Es wird ein Verfahren zur Reinigung von Hafer-Phytochrom beschrieben, das ca. 100fach angereichertes Phytochrom mit MG = 240000 liefert.

3) Durch quantitative Denaturierung und quantitativen Peptidabbau konnten die Extinktionskoeffizienten folgender nativer Pigmente bestimmt werden.

a) C-Phycocyanin (pro Chromophor):

ε_{620} = 103000 ± 7000 (l/M x cm)

ε_{360} = 19000 ± 1000 (l/M x cm)

b) Allophycocyanin (pro Chromophor):

ε_{650} = 103000 ± 7000 (l/ M x cm)

ε_{350} = 21000 ± 1000 (l/M x cm)

c) P_r (pro Chromophor)

ε_{665} = 120000 ± 6000 (l/M x cm)

ε_{380} = 36000 (l/M x cm)

4) Es konnte die Chromophorzahl für Phytochrom mit MG = 60000 mit 1 und für Phytochrom mit MG = 240000 mit wahrscheinlich 1 errechnet werden.

5) Es konnte gezeigt werden, daß bei der säurekatalysierten Chromophorabspaltung aus C-Phycocyanin als Hauptprodukt E-PCB und als Nebenprodukt Z-PCB entstehen. Die Abspaltung des Chromophors aus C-Phycoerythrin liefert ein Diastereomeren-Paar; es konnte gezeigt werden, daß sich die PEB-Diastereomeren an C2 und C16 unter den Bedingungen der Säureabspaltung ineinander umwandeln.

Synthetisches E-PCT reagiert mit Bromwasserstoff und Methanol zum Methanoladdukt an die Vinylgruppe von Ring D des E-PCT; synthetisches Z-PCT hingegen reagiert zu einem Produktgemisch aus E-PCT und dem Methanoladdukt an die Vinylgruppe von Ring D des E-PCT.

6) Es konnte durch a) DC-Analyse und b) rechnerische Spektralauswertung gezeigt werden, daß die säurekatalysierte Chromophorabspaltung aus P_r-Chromopeptid die Produkte E-PCT und ein Methanoladdukt an die Vinylgruppe von Ring D des E-PCT liefert. Dies ist die erste Präparation eines definierten Bilinpigments aus Phytochrom. Es wurde ein Reaktionsmechanismus formuliert, der E-PCT und Z-PCT als primäre Produkte der sauren Chromophorabspaltung aus P_r-Chromopeptid charakterisiert.

7) Es wurden CD-Messungen an Phytochrom mit MG = 60000 und MG = 240000 im Sichtbaren und im nahen UV durchgeführt, und zwar a) von P_r, b) von P_{fr}, c) vom P_r-Kation und d) vom P_{fr}-Kation. Hoch- und niedermolekulares Phytochrom stimmen qualitativ vollkommen überein.
Gegenüber früheren CD-Messungen von P_r und P_{fr} wurden hier a) durch exaktere Messung eine Feinstruktur ermittelt und b) ausgehend von niedermolekularem Phytochrom exakte quantitative Daten ermittelt. Es gelang dadurch das CD-Spektrum von P_{fr} umzurechnen. Ebenso das CD-Spektrum des P_{fr}-Kations.

8) Der Vergleich der CD-Spektren von P_r und P_r-Kation zeigt, a) daß diese in den beiden sichtbaren Banden entgegengesetztes Vorzeichen haben, aber keine einfachen Enantiomeren sind und b) daß das native Protein den Chromophor in eine stark gespannte Konformation zwingt.
Der Vergleich der CD-Spektren von P_r-Kation und P_r-Chromopeptid (Kation) zeigt im Sichtbaren vollständige qualitative Übereinstimmung. Quantitative Übereinstimmung läßt sich erst herstellen, wenn das P_r-Chromopeptid in das gleiche denaturierende Milieu aus Harnstoff gebracht wird wie das P_r-Kation. Dies zeigt, daß im P_r-Chromopeptid noch ein Rest der Wirkung des nativen Proteins erhalten ist.
Im UV-Bereich des P_r-Chromopeptids ist im Bereich von Histidin eine deutliche negative Elliptizität, die bei Zugabe von Harnstoff abnimmt. Ein Einfluß von Histidin auf die Konformation des Chromopeptids wird diskutiert.

9) Der Vergleich der CD-Spektren von P_{fr} und P_{fr}-Kation zeigt bei der roten Bande eine deutliche hypsochrome Verschiebung von P_{fr}(710nm) zum P_{fr}-Kation (625nm). Dies bestätigt frühere Befunde über ein verkürztes konjugiertes System des freien Chromophors gegenüber dem nativen Pigment. Da das Vorzeichen der Banden erhalten bleibt, ist im P_{fr} der Einfluß des Proteins auf die Konformation des Chromophors nicht so drastisch wie beim P_r. Die gegenüber der Absorption (725nm) verschobene CD-Bande von P_{fr} bei 710nm ist ein Hinweis auf verschiedene Populationen oder Übergänge beim nativen P_{fr}.

10) Der Vergleich der CD-Spektren von denaturiertem C-Phycocyanin von Spirulina platensis und denaturiertem Phytochrom zeigt, daß die drei gemeinsamen Chiralitätszentren der freien Chromophore nicht nur dieselbe relative, sondern auch dieselbe absolute Konfiguration besitzen, und zwar höchstwahrscheinlich RRR.

11) Es ist gelungen ein P_{fr}-Chromopeptid herzustellen, zu reinigen und zu charakterisieren. Es hat folgende Eigenschaften: a) es hat Absorptionsmaxima bei 610 und 380nm, b) es wandelt sich langsam thermisch oder sofort bei Belichtung in das P_r-Chromopeptid um, wobei sich die rote Bande nach 650nm verschiebt und die blaue Bande erhöht, c) bei dieser Umwandlung ist keine Substanz festzustellen, die frei wird, d) P_{fr}- und P_r-Chromopeptid verhalten sich chromatographisch verschieden, wodurch sie sich auch trennen lassen: P_{fr}-Chromopeptid erscheint nach Außen größer (P 10-Biogel Eluat) und geringer geladen (Kieselgel Eluat) als P_r-Chromopeptid, e) eine Umwandlung von P_{fr}- in P_r-Chromopeptid läßt sich reduktiv und anaerob oxidativ katalysieren, f) das P_{fr}-Chromopeptid ist kein Violin-Chromophor, läßt sich aber aerob oxidativ in ein Violin verwandeln (Maxima: 600 und 340nm), g) die Befunde legen eine E/Z-Isomerisierung der Methinbrücke zwischen Ring A und B nahe.

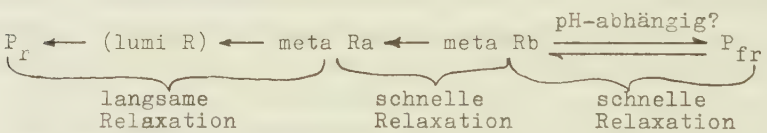
12) Es konnte nachgewiesen werden, daß alle drei Bedingungen für eine Dunkelreversion als spontane Rückumwandlung von P_{fr} in P_r im Dunkeln nicht erfüllt sind:
a) Das Verhältnis der Kinetiken bei 665 und 730nm ist deutlich von 1 verschieden.

b) Bei Variation der Bedingungen (Temperatur, Hydratationsgrad, pH-Wert) ändern sich die Kinetiken bei 665 und 730nm nicht gleichsinnig.
c) Der Endpunkt der Kinetiken ist nicht P_r.
Es wird deshalb vorgeschlagen von Dunkelrelaxation zu sprechen, wobei sowohl die im Licht gebildeten Zwischenstufen wie auch P_{fr} sich schrittweise umwandeln.

13) Es konnte nachgewiesen werden, daß es auch eine geringfügige Dunkelrelaxation von P_r gibt, die von der Art der Vorbelichtung abhängt.

14) Aus wechselnder HR/DR-Belichtung läßt sich der bei saturierender HR-Belichtung (mit 64 W/m^2) gebildete Anteil an stark photogebleichten Intermediaten bei 4°C zu mindestens 8% des Gesamtphytochroms angeben.

15) Es konnte durch Vergleich der hier beobachteten langlebigen Intermediate mit bekannten Intermediaten ein Modell für den Verlauf der Dunkelrelaxation wahrscheinlich gemacht werden, wobei jede der beteiligten Teilreaktionen mit einer eigenen Kinetik 1.Ordnung in den kinetischen Gesamtverlauf eingeht:



16) Für die Gesamtgeschwindigkeit der Dunkelrelaxation gilt:
a) In saurem Milieu ist sie schneller als in basischem ('pK-Wert' = 6).
b) Bei tieferer Temperatur ist sie verlangsamt.
c) Dehydratation wirkt verlangsamend.
d) Wenn man statt Phytochrom mit MG = 240000 das Phytochrom mit MG = 60000 verwendet sind die Kinetiken um ca. 12% langsamer. (Der qualitative Verlauf zeigt keine Unterschiede).
e) Die Geschwindigkeit der Kinetiken läßt sich reduzieren, wenn die Intensität des Lichts reduziert wird, mit dem die saturierende HR-Belichtung bewirkt wird.

17) Der Endpunkt der Kinetiken hängt von dem Grad der sättigenden HR-Einstrahlung ab, wobei die gebildeten Intermediate zu 100% zu P_r revertieren und das gebildete P_{fr} zu 55%. Dies bedeutet, daß entweder zwei Populationen P_{fr} vorliegen oder Phytochrom ein Oszillator ist.

18) Mit Reduktionsmitteln wird allgemein die Dunkelrelaxation von Phytochrom beschleunigt. Im einzelnen wurden bei Zugabe von Natriumdithionit in 100 bis 1000fachem Überschuß folgende Ergebnisse erzielt:
a) Bei -25°C, pH 8 in glycerinhaltiger Lösung wurde innerhalb von 30min. eine Potentialdifferenz von 16mV ermittelt.
b) Es erfolgt eine reversible Reduktion des Chromophors zwischen Ring B und C zu einem Rubin (Maximum 420nm). Die Sensibilität dieser Wellenlänge gegenüber Licht ist erhöht.
c) Bei 580nm bildet sich ein irreversibles Maximum aus, das nur bei der Umwandlung von P_r in P_{fr} entsteht. Dabei wird primär die Schulter von P_r bei 615nm gelöscht. Bei HR-Dauerlicht läßt sich fast das gesamte Pigment in diese Form umwandeln. Wenn man mit HR-Licht saturierend rückbelichtet und vorsichtig auf pH 3 ansäuert, verschiebt sich die 580nm-Absorption nach 615nm.
d) Bei HR-Dauerlicht tritt bei 540nm ein zusätzliches kleines irreversibles Maximum auf.
e) Das Spektrum bleicht insgesamt stark aus, die P_{fr}-Form jedoch stärker als die P_r-Form. Dieser Ausbleicheffekt ist im Dunkeln teilweise reversibel, d.h. eine stark photogebleichte Form muß vorliegen.
f) Alle diese Effekte sind stark pH-abhängig.

19) Es wird diskutiert, ob die bei 580nm unter reduzierenden Bedingungen beobachtete Spezies meta Rb ist, das durch eine chemische Modifizierung blockiert ist.

20) Die Rückwirkung der Dunkelrelaxation auf die Spektraleigenschaften von Phytochrom wurde rechnerisch abgeschätzt. Dabei ergab sich, daß die schnellen Prozesse innerhalb der ersten Minuten nach sättigender HR-Belichtung von beachtlichem quantitativem Ausmaß sind; z.B. ergibt sich bei 665nm/pH 7/4°C/

Pufferlösung nach 5min. ein Grenzwert von ca. 10% der Extinktionsdifferenz von P_r und P_{fr}. Deshalb sind alle Berechnungen, die bislang am Spektrum von Phytochrom angestellt wurden relativiert, da sie sich in einem undefinierten Bereich zwischen photostationärem Gleichgewicht und Dunkelgleichgewicht (= thermodynamisches Gleichgewicht) bewegen.

21) Die mögliche physiologische Bedeutung der beobachteten Dunkelrelaxationsphänomene wird diskutiert.

VI) TABELLEN

Im Tabellenanhang sind sämtliche kinetische Daten (ohne Reduktionsmittel) zusammengefaßt (Punkt 1) und durch Quotientenbildung analysiert (Punkt 2); soweit sich bei der Faktorenanalyse kein spezifischer Gang ergibt, ist im Punkt 1) ein Mittelwert gebildet. Im Punkt 3) sind absolute Spektraldaten zusammengefaßt und gemittelt, da sich dort kein spezifischer Gang findet.
Allen hier zusammengestellten Kinetiken liegt ein Endpunkt von 100% P_r zugrunde. Für andere Endpunkte gilt die Umrechnung gemäß Kapitel II, Punkt 9.3). Allen kinetischen Daten liegt hochmolekulares Haferphytochrom zugrunde.

1) Meßergebnisse

Tabelle 17)
Kinetik der langsamen Komponente bei 665nm; 4°C/Pufferlösung; die mit ≠ bezeichneten Werte beruhen auf nur einer Messung. Anteil an der Gesamtkinetik = 91 ± 3%.

pH-Wert	Halbwertszeit (h)	Geschwindigkeitskonstante k x 10^5
5,5 ≠	2,73	7,06
6	2,50 ± 0,67	7,74
6,5	2,44 ± 0,66	7,90
7	2,26 ± 0,20	8,53
7,5	1,92 ± 0,10	10,03
8	1,66 ± 0,27	12,20
8,5 ≠	2,82	6,83
9 ≠	2,66	7,24
9,5 ≠	2,56	7,52
10 ≠	3,63	5,30

Tabelle 18)
Kinetik der langsamen Komponente bei 730nm; 4°C/Pufferlösung; die mit ≠ bezeichneten Werte beruhen auf nur einer Messung. Anteil an der Gesamtkinetik: 95 ± 2%.

pH-Wert	Halbwertszeit (h)	Geschwindigkeitskonstante k x 10^5
5,5 ≠	1,29	-14,90
6	2,16 ± 0,07	- 8,95
6,5	3,04 ± 0,54	- 6,33
7	3,92 ± 0,83	- 4,91
7,5	4,59 ± 0,98	- 4,19
8	18,60 ± 1,44	- 1,04
8,5 ≠	6,87	- 2,80
9 ≠	4,64	- 4,15
9,5 ≠	3,81	- 5,05

Tabelle 19)
Kinetik der langsamen Komponente bei 665nm; 4°C/Puffer + Glycerin (1 : 1); die mit ≠ bezeichneten Werte beruhen auf nur einer Messung. Anteil an der Gesamtkinetik: 92 ± 4%.

pH-Wert	Halbwertszeit (h)	Geschwindigkeitskonstante k x 10^5
5,5 ≠	1,88	10,22
6	1,81	10,67
6,5	1,89	10,18
7	2,00	9,61
7,5	2,25	8,55
8	3,52	5,46
8,5 ≠	4,73	4,07
9 ≠	5,92	3,25
9,5 ≠	6,61	2,91
10 ≠	2,75	7,01

Tabelle 20)
Kinetik der langsamen Komponente bei 730nm; 4°C/Puffer + Glycerin (1 : 1); die mit ≠ bezeichneten Werte beruhen auf nur einer Messung; a) Anteil an der Gesamtkinetik: 93%.

pH-Wert	Halbwertszeit (h) bzw. Anstiegszeit (sec.)	Geschwindigkeitskonstante k x 10^5
5,5 ≠	3,02 h	- 6,37[a)]
6	2,94 h	- 6,56[a)]
6,5	2,26 h	- 8,52[a)]
7	80 - 120 sec.	-
7,5	100 - 140 sec.	-
8	120 - 160 sec.	-
8,5 ≠	140 - 180 sec.	-
9 ≠	180 - 280 sec.	-
9,5 ≠	200 - 300 sec.	-
10 ≠	konstant	-

Tabelle 21)
Kinetik der langsamen Komponente bei 665nm; 25°C/Pufferlösung; die mit ≠ bezeichneten Werte beruhen auf nur einer Messung. Anteil an der Gesamtkinetik: 90%.

pH-Wert	Halbwertszeit (h)	Geschwindigkeitskonstante k x 10^5
6 ≠	1,14	16,87
7	1,13	16,99
8 ≠	1,73	11,12

Tabelle 22)
Kinetik der langsamen Komponente bei 730nm; 25°C/Pufferlösung; die mit ≠ bezeichneten Werte beruhen auf nur einer Messung. Anteil an der Gesamtkinetik: 94%.

pH-Wert	Halbwertszeit (h)	Geschwindigkeitskonstante k x 10^5
6 ≠	3,14	- 6,13
7	1,92	-10,01
8	2,92	- 6,60

Tabelle 23)
Kinetik der langsamen Komponente bei 665nm; 25°C/Puffer + Glycerin (1 : 1); alle Werte beruhen auf nur einer Messung. Anteil an der Gesamtkinetik: 95%.

pH-Wert	Halbwertszeit (h)	Geschwindigkeitskonstante k x 10^5
6	2,27	8,49
7	2,29	8,40
8	3,37	5,72

Tabelle 24)
Kinetik der langsamen Komponente bei 730nm; 25°C/Puffer + Glycerin (1 : 1); alle Werte beruhen auf nur einer Messung. Anteil an der Gesamtkinetik: 95%.

pH-Wert	Halbwertszeit (h)	Geschwindigkeitskonstante k x 10^5
6	3,65	- 5,28
7	3,15	- 6,12
8	2,54	- 7,57

Tabelle 25)
Kinetik der langsamen Komponente bei 665nm; -10°C/Puffer + Glycerin (1 : 1); die mit ≠ bezeichneten Werte beruhen auf nur einer Messung. Anteil an der Gesamtkinetik: 91 ± 5%.

pH-Wert	Halbwertszeit (h)	Geschwindigkeitskonstante k x 10^5
6 ≠	3,00	6,41
7	2,12	10,40
7,5 ≠	2,56	7,51
8	2,28	8,47

Tabelle 26)
Kinetisches Verhalten bei -10°C/Puffer + Glycerin (1 : 1) und 730nm.

pH-Wert	Anstiegshöhe nach 10min. in % von $P_r$max
6	ca. 4%
7	ca. 3%
7,5	ca.12%
8	ca.11%

Tabelle 27)
Kinetik der langsamen Komponente bei 730, 710 und 698nm; $4^{o}C$, Pufferlösung; Anteil an der Gesamtkinetik: 95% ± 2%.

Wellenlänge(nm)	Halbwertszeit (h)	Geschwindigkeitskonstante k x 10^5	pH-Wert
730	2,16	- 8,95	
710	2,49	- 7,74	6
698	2,14	- 8,98	
730	3,04	- 6,33	
710	3,88	- 4,96	6,5
698	2,12	- 9,07	
730	3,92	- 4,91	
710	4,17	- 4,62	7
698	5,54	- 3,49	
730	4,59	- 4,19	
710	11,14	- 1,73	7,5
698	9,81 (oder konstant)	- 1,96	
730	18,60	- 1,04	
710	11,60	- 1,66	8
698	konstant	konstant	

Tabelle 28)
Kinetik der langsamen Komponente bei 730, 720, 710 und 698nm; 4°C/Puffer + Glycerin (1 : 1); ≠ bei 698nm/pH 6,5 wurde einmal eine Anstiegszeit von 100 - 140sec. gemessen; a) Anteil an der Gesamtkinetik: 93%.

Wellenlänge(nm)	Halbwertszeit (h)	Anstiegszeit (sec.)	Geschwindigkeitskonstante k x 10^5	pH-Wert
730	2,26	-	- 8,52[a)]	
710	2,78	-	- 6,94[a)]	6,5
698	3,80	100 - 140≠	- 5,06[a)]	
730	-	80 - 120	-	
710	-	80 - 120	-	7
698	-	160 - 220	-	
730	-	100 - 140	-	
720	-	150 - 250	-	7,5
710	-	200 - 300	-	
698	-	200 - ?	-	

Tabelle 29)
Kinetik der schnellen Komponente bei 665nm; 4°C/Pufferlösung; die mit ≠ bezeichneten Werte beruhen auf nur einer Messung. Anteil an der Gesamtkinetik: 9 ± 3%.

pH-Wert	Halbwertszeit (sec.)	Geschwindigkeitskonstante k x 10^2
5,5 ≠	55,0	1,26
6	64,6	1,07
6,5	42,0	1,65
7	59,7	1,17
7,5	47,6	1,46
8	43,7	1,59
8,5 ≠	26,5	2,64
9 ≠	31,3	2,21
9,5 ≠	48,0	1,44
Mittelwert	46,5	1,49

Tabelle 30)
Kinetik der schnellen Komponente bei 730nm; 4°C/Pufferlösung; die mit ≠ bezeichneten Werte beruhen auf nur einer Messung. Anteil an der Gesamtkinetik: 5 ± 2%.

pH-Wert	Halbwertszeit (sec.)	Geschwindigkeitskonstante $k \times 10^2$
5,5 ≠	61,3	- 1,13
6	80,2	- 0,87
6,5	62,1	- 1,12
7	76,3	- 0,90
7,5	85,2	- 0,81
8	67,1	- 1,03
8,5 ≠	60,0	- 1,16
9 ≠	48,0	- 1,44
Mittelwert	67,5	- 1,03

Tabelle 31)
Kinetik der schnellen Komponente bei 665nm; 4°C/Puffer + Glycerin (1 : 1); die mit ≠ bezeichneten Werte beruhen auf nur einer Messung. Anteil an der Gesamtkinetik: 8 ± 4%.

pH-Wert	Halbwertszeit (sec.)	Geschwindigkeitskonstante $k \times 10^2$
5,5 ≠	46,7	1,48
6	65,9	1,05
6,5	68,2	1,02
7	48,2	1,44
7,5	52,6	1,32
8	37,0	1,87
8,5 ≠	43,8	1,58
9 ≠	40,2	1,72
9,5 ≠	33,1	2,09
10 ≠	59,2	1,17
Mittelwert	49,5	1,40

Tabelle 32)
Kinetik der schnellen Komponente bei 730nm; 4°C/Puffer + Glycerin (1 : 1); der mit ≠ bezeichnete Wert beruht auf nur einer Messung. Anteil an der Gesamtkinetik: 7%.

pH-Wert	Halbwertszeit (sec.)	Geschwindigkeitskonstante $k \times 10^2$
5,5 ≠	42,2	- 1,64
6	70,5	- 0,98
6,5	58,3	- 1,19
Mittelwert	57,0	- 1,22

Tabelle 33)
Kinetik der schnellen Komponente bei 665nm; -10°C/Puffer + Glycerin (1 : 1); die mit ≠ bezeichneten Werte beruhen auf nur einer Messung. Anteil an der Gesamtkinetik: 9 ± 5%.

pH-Wert	Halbwertszeit (sec.)	Geschwindigkeitskonstante $k \times 10^2$
6 ≠	91,2	0,76
7	70,6	1,00
7,5 ≠	51,9	1,34
8	60,9	1,15
Mittelwert	68,7	1,01

Tabelle 34)
Kinetik der schnellen Komponente bei 665nm; 25°C/Pufferlösung; die mit ≠ bezeichneten Werte beruhen auf nur einer Messung. Anteil an der Gesamtkinetik: 10%.

pH-Wert	Halbwertszeit (sec.)	Geschwindigkeitskonstante k x 10^2
6 ≠	37,5	1,85
7	29,2	2,37
8 ≠	40,8	1,70
Mittelwert	35,2	1,97

Tabelle 35)
Kinetik der schnellen Komponente bei 730nm; 25°C/Pufferlösung; die mit ≠ bezeichneten Werte beruhen auf nur einer Messung. Anteil an der Gesamtkinetik: 6%.

pH-Wert	Halbwertszeit (sec.)	Geschwindigkeitskonstante k x 10^2
6 ≠	38,1	- 1,82
7	39,8	- 1,74
8 ≠	44,4	- 1,56
Mittelwert	40,5	- 1,71

Tabelle 36)
Kinetik der schnellen Komponente bei 665nm; 25°C/Puffer + Glycerin (1 : 1); alle Werte beruhen auf nur einer Messung. Anteil an der Gesamtkinetik: 5%.

pH-Wert	Halbwertszeit (sec.)	Geschwindigkeitskonstante k x 10^2
6	39,4	1,76
7	23,7	2,92
8	36,1	1,92
Mittelwert	33,2	2,09

Tabelle 37)
Kinetik der schnellen Komponente bei 730nm; 25°C/Puffer + Glycerin (1 : 1); alle Werte beruhen auf nur einer Messung. Anteil an der Gesamtkinetik: 5%.

pH-Wert	Halbwertszeit (sec.)	Geschwindigkeitskonstante k x 10^2
6	35,4	- 1,96
7	30,0	- 2,31
8	43,1	- 1,61
Mittelwert	36,1	- 1,92

Tabelle 38)

Kinetik der schnellen Komponente bei 730, 710 und 698nm; 4°C/Pufferlösung, Anteil an der Gesamtkinetik: 5 ± 2%.

Wellenlänge (nm)	Halbwertszeit (sec.)	Geschwindigkeits-konstante k x 10^2	pH-Wert
730	80,2	- 0,87	
710	69,4	- 1,00	6
698	86,0	- 0,81	
730	62,1	- 1,12	
710	61,5	- 1,13	6,5
698	40,0	- 1,73	
730	76,3	- 0,90	
710	105,0	- 0,66	7
698	73,4	- 0,95	
730	85,2	- 0,83	
710	77,1	- 0,90	7,5
698	58,6 (oder konstant)	- 1,18	
730	67,1	- 1,03	
710	85,5	- 0,81	8
698	86,1	- 0,80	
730	67,5	- 1,03	
710	79,7	- 0,87	Mittelwert
698	68,8	- 1,01	

Tabelle 39)
Kinetik der schnellen Komponente bei 730, 710 und 698nm; $4^{o}C$/Puffer + Glycerin (1 : 1). Anteil an der Gesamtkinetik: 7%.

Wellenlänge (nm)	Halbwertszeit (sec.)	Geschwindigkeitskonstante k x 10^2	pH-Wert
730	58,3	- 1,19	
710	83,8	- 0,83	6,5
698	95,8 (oder: 100 - 140sec. Anstieg)	- 0,72	

Tabelle 40)
Kinetisches Anfangsverhalten (15 - 20min.) bei 580 und 420nm.

Temperatur (°C)	Lösung	pH-Wert	kinetisches Verhalten bei 580nm
25	Puffer	6 - 8	Zunahme der Extinktion
25	Puffer + Glycerin (1 : 1)	6 - 8	konstant
4	Puffer	6 - 8	Zunahme der Extinktion
4	Puffer + Glycerin (1 : 1)	6 - 8	konstant
-10	Puffer + Glycerin (1 : 1)	6 - 7	konstant
		7,5 - 8	Abnahme der Extinktion
			kinetisches Verhalten bei 420nm
25	Puffer	6 - 8	konstant (Abnahme)
25	Puffer + Glycerin (1 : 1)	6 - 8	konstant
4	Puffer	6 - 8	konstant (Abnahme)
4	Puffer + Glycerin (1 : 1)	6 - 8	konstant
-10	Puffer + Glycerin (1 : 1)	6 - 7	Zunahme der Extinktion
		7,5 - 8	konstant (Zunahme)

2) Faktorenanalyse.

Tabelle 41)
Verhältnis der Halbwertszeiten der langsamen Komponente von 665nm/730nm, 730nm/710nm und 710nm/698nm in Pufferlösung bei 4°C.

pH-Wert	665nm / 730nm	730nm / 710nm	710nm / 698nm
5,5	2,12	-	-
6	1,16	0,87	1,16
6,5	0,80	0,78	1,83
7	0,58	0,94	0,75
7,5	0,42	0,41	1,14
8	0,09	1,60	-
8,5	0,41	-	-
9	0,57	-	-
9,5	0,67	-	-

Tabelle 42)
Verhältnis der Halbwertszeiten der langsamen Komponente von 665nm/730nm, 730nm/710nm und 710nm/698nm in Puffer + Glycerin (1 : 1) bei 4°C.

pH-Wert	665nm / 730nm	730nm / 710nm	710nm / 698nm
5,5	0,62	-	-
6	0,62	-	-
6,5	0,84	0,81	0,73

Tabelle 43)
Verhältnis der Halbwertszeiten der langsamen Komponente von 665nm/730nm in Pufferlösung bzw. in Puffer + Glycerin (1 : 1) bei 25°C.

pH-Wert	$\frac{665nm}{730nm}$ (25°C)	$\frac{665nm}{730nm}$ (25°C/1:1)
6	0,36	0,62
7	0,59	0,73
8	0,59	1,33

Tabelle 44)
Verhältnis der Halbwertszeiten der langsamen Komponente von 25°C/4°C in Pufferlösung bzw. in Puffer + Glycerin (1 : 1) und von 4°C/-10°C in Puffer + Glycerin (1 : 1).

pH-Wert	665nm	730nm	Verhältnis
6	0,46	1,45	
7	0,50	0,49	25°C/4°C
8	1,04	0,16	
6	1,25	1,24	
7	1,15	-	$\frac{25°C(1:1)}{4°C(1:1)}$
8	0,96	-	
6	0,83	-	
7	1,07	-	$\frac{4°C(1:1)}{-10°C(1:1)}$
7,5	0,88	-	
8	0,73	-	
Durchschnitt	0,88	0,84	- Δ19°C

Tabelle 45)
Verhältnis der Halbwertszeiten der langsamen Komponente von Puffer + Glycerin (1 : 1) zu Pufferlösung bei 665nm und 4°C.

pH-Wert	5,5	6	6,5	7	7,5	8	8,5	9	9,5	10
1:1 / Puffer	0,69	0,72	0,77	0,88	1,17	2,12	1,68	2,23	2,58	0,76

Tabelle 46)
Verhältnis der Halbwertszeiten der langsamen Komponente von Puffer + Glycerin (1 : 1) zu Pufferlösung bei 730, 710 und 698nm und 4°C.

pH-Wert	730nm	710nm	698nm
5,5	2,34	-	-
6	1,36	-	-
6,5	0,74	0,72	1,79

Tabelle 47)
Verhältnis der Halbwertszeiten der langsamen Komponente von Puffer + Glycerin (1 : 1) zu Pufferlösung bei 665 und 730nm und 25°C.

pH-Wert	665nm	730nm
6	1,99	1,16
7	2,03	1,64
8	1,94	0,87

Tabelle 48)
Verhältnis der Halbwertszeiten der langsamen Komponente von pH_I zu pH_{II} in Pufferlösung bei 4°C.

Verhältnis der pH-Werte	665nm	730nm
5,5/6	1,09	0,60
6/6,5	1,03	0,71
6,5/7	1,08	0,78
7/7,5	1,18	0,85
7,5/8	1,16	0,25
8/8,5	0,59	2,71
8,5/9	1,06	1,48
9/9,5	1,04	1,22
9,5/10	0,71	-

Tabelle 49)
Verhältnis der Halbwertszeiten der langsamen Komponente von pH_I zu pH_{II} in Puffer + Glycerin (1 : 1) bei 4°C.

Verhältnis der pH-Werte	665nm	730nm
5,5/6	1,04	1,03
6/6,5	0,96	1,30
6,5/7	0,95	-
7/7,5	0,89	-
7,5/8	0,64	-
8/8,5	0,74	-
8,5/9	0,80	-
9/9,5	0,90	-

Tabelle 50)
Verhältnis der Halbwertszeiten der langsamen Komponente von pH_I zu pH_{II} in Pufferlösung bei 4^oC.

Verhältnis der pH-Werte	730nm	710nm	698nm
6/6,5	0,71	0,64	1,01
6,5/7	0,78	0,93	0,38
7/7,5	0,85	0,37	0,57
7,5/8	0,25	0,96	-

Tabelle 51)
Verhältnis der Halbwertszeiten der langsamen Komponente von pH_I zu pH_{II} in Pufferlösung bzw. Puffer + Glycerin (1 : 1) bei 25^oC.

Verhältnis der pH-Werte	665nm	730nm	Lösung
6/7	1,00	1,63	Puffer
7/8	0,65	0,66	
6/7	0,99	1,16	1:1
7/8	0,68	1,24	

Tabelle 52)
Verhältnis der Halbwertszeiten der schnellen Komponente von 665nm/730nm, 730nm/710nm und 710nm/698nm in Pufferlösung bei 4°C.

pH-Wert	$\frac{665nm}{730nm}$	$\frac{730nm}{710nm}$	$\frac{710nm}{698nm}$
5,5	0,90	-	-
6	0,81	1,16	0,81
6,5	0,68	1,01	1,54
7	0,78	0,73	1,43
7,5	0,56	1,08	1,32
8	0,65	0,78	0,99
8,5	0,44	-	-
9	0,65	-	-

Tabelle 53)
Verhältnis der Halbwertszeiten der schnellen Komponente von 665nm/730nm, 730nm/710nm und 710nm/698nm in Puffer + Glycerin (1 : 1) bei 4°C.

pH-Wert	$\frac{665nm}{730nm}$	$\frac{730nm}{710nm}$	$\frac{710nm}{698nm}$
5,5	1,11	-	-
6	0,93	-	-
6,5	1,17	0,70	0,87

Tabelle 54)
Verhältnis der Halbwertszeiten der schnellen Komponente von 665nm/730nm in Pufferlösung bzw. Puffer + Glycerin (1 : 1) bei 25°C.

pH-Wert	$\frac{665nm}{730nm}$	Lösung
6	0,99	
7	0,74	Puffer
8	0,92	
6	1,11	
7	0,79	1:1
8	0,84	

Tabelle 55)
Verhältnis der Halbwertszeiten der schnellen Komponente von 25°C/4°C in Pufferlösung bzw. in Puffer + Glycerin (1 : 1) und von 4°C/-10°C in Puffer + Glycerin (1 : 1).

pH-Wert	665nm	730nm	Verhältnis
6	0,58	0,48	
7	0,50	0,52	25°C/4°C
8	0,93	0,66	
6	0,60	0,50	
7	0,49	-	$\frac{25°C(1:1)}{4°C(1:1)}$
8	0,98	-	
6	0,72	-	
7	0,68	-	
7,5	1,01	-	$\frac{4°C(1:1)}{-10°C(1:1)}$
8	0,61	-	
Durchschnitt	0,71	0,54	- $\Delta 19°C$

Tabelle 56)
Verhältnis der Halbwertszeiten der schnellen Komponente von Puffer + Glycerin (1 : 1) zu Pufferlösung bei 25°C.

pH-Wert	665nm	730nm
6	1,05	0,93
7	0,81	0,75
8	0,89	0,97

Tabelle 57)
Verhältnis der Halbwertszeiten der schnellen Komponente von Puffer + Glycerin (1 : 1) zu Pufferlösung bei 665nm und 4°C.

pH-Wert	5,5	6	6,5	7	7,5	8	8,5	9	9,5
$\frac{1:1}{\text{Puffer}}$	0,85	1,02	1,62	0,81	1,11	0,85	1,65	1,28	0,69

Tabelle 58)
Verhältnis der Halbwertszeiten der schnellen Komponente von Puffer + Glycerin (1 : 1) zu Pufferlösung bei 730nm, 710nm und 698nm und 4°C.

pH-Wert	730nm	710nm	698nm
5,5	0,69	-	-
6	0,88	-	-
6,5	0,94	1,36	2,40

Tabelle 59)
Verhältnis der Halbwertszeiten der schnellen Komponente von pH_I zu pH_{II} in Pufferlösung bei 4°C.

Verhältnis der pH-Werte	665nm	730nm
5,5/6	0,85	0,78
6/6,5	1,53	1,27
6,5/7	0,70	0,82
7/7,5	1,25	0,89
7,5/8	1,09	1,27
8/8,5	1,65	1,12
8,5/9	0,85	1,25
9/9,5	0,65	-

Tabelle 60)
Verhältnis der Halbwertszeiten der schnellen Komponente von pH_I zu pH_{II} in Pufferlösung bei 4°C.

Verhältnis der pH-Werte	730nm	710nm	698nm
6/6,5	1,29	1,13	2,15
6,5/7	0,81	0,59	0,55
7/7,5	0,90	1,36	1,25
7,5/8	1,27	0,90	0,68

Tabelle 61)
Verhältnis der Halbwertszeiten der schnellen Komponente in Puffer + Glycerin (1 : 1) bei 4°C.

Verhältnis der pH-Werte	665nm	730nm
5,5/6	0,71	0,60
6/6,5	0,97	1,21
6,5/7	1,41	-
7/7,5	0,92	-
7,5/8	1,42	-
8/8,5	0,84	-
8,5/9	1,09	-
9/9,5	1,21	-
9,5/10	0,56	-

Tabelle 62)
Verhältnis der Halbwertszeiten der schnellen Komponente in Pufferlösung bzw. Puffer + Glycerin (1 : 1) bei 25°C.

Verhältnis der pH-Werte	665nm	730nm	Lösung
6/7	1,28	0,96	Puffer
7/8	0,72	0,90	
6/7	1,66	1,18	1:1
7/8	0,66	0,70	

3) Spektraldaten

Tabelle 63)
Extinktionsdifferenz bei 665nm in % von $E_{P_{fr}/665}$ bezogen auf Endpunkt $E_{P_r/665}$ in Pufferlösung /4°C.
Fall A) Im photostationären Gleichgewicht, errechnet aus (langsame + schnelle Komponente) zur Zeit t = 0;
Fall B) Wie unter A), aber nur mit dem Anteil der langsamen Komponente allein zur Zeit t = 0;
Fall C) Im Gleichgewicht zur Zeit t = 140sec., errechnet aus (langsame + schnelle Komponente) zur Zeit t = 140sec.;

pH-Wert	Fall A) $(\Delta E_o/E_o)100\%$	Fall B) $(\Delta E_o\text{langs.}/E_o)100\%$	Fall C) $(\Delta E_{140"}/E_{140"})100\%$
6	115	105	92
6,5	105	96	87
7	121	110	95
7,5	94	86	79
8	107	97	87
Mittelwert	108	99	88

Tabelle 64)
Extinktionsdifferenz bei 665nm in % von $E_{P_{fr}/665}$ bezogen auf Endpunkt $E_{P_r/665}$ in Puffer + Glycerin (1 : 1)/4°C.
Fall A) Im photostationären Gleichgewicht, errechnet aus (langsame + schnelle Komponente) zur Zeit t = 0;
Fall B) Wie unter A), aber nur mit dem Anteil der langsamen Komponente allein zur Zeit t = 0;
Fall C) Im Gleichgewicht zur Zeit t = 140sec., errechnet aus (langsame + schnelle Komponente) zur Zeit t = 140sec.;

pH-Wert	Fall A) $(\Delta E_o/E_o)100\%$	Fall B) $(\Delta E_o\text{langs.}/E_o)100\%$	Fall C) $(\Delta E_{140"}/E_{140"})100\%$
6	105	97	88
6,5	88	81	77
7	88	81	77
7,5	95	87	82
8	92	85	81
Mittelwert	94	86	81

Tabelle 65)
Extinktionsdifferenz bei 730nm in % von $E_{P_{fr}/730}$ bezogen auf Endpunkt $E_{P_r/730}$ in Pufferlösung/4°C.
Fall A) Im photostationären Gleichgewicht, errechnet aus (langsame + schnelle Komponente) zur Zeit t = 0;
Fall B) Wie unter A), aber nur mit dem Anteil der langsamen Komponente allein zur Zeit t = 0;

pH-Wert	Fall A) $(\Delta E_o/E_o)100\%$	Fall B) $(\Delta E_o \text{langs.}/E_o)100\%$
6	99	94
6,5	86	82
7	91	87
7,5	85	81
8	97	92
Mittelwert	92	87

Tabelle 66)
Extinktionsdifferenz bei 710nm in % von $E_{P_{fr}/710}$ bezogen auf Endpunkt $E_{P_r/710}$ in Pufferlösung/4°C.
Fall A) Im photostationären Gleichgewicht, errechnet aus (langsame + schnelle Komponente) zur Zeit t = 0;
Fall B) Wie unter A), aber nur mit dem Anteil der langsamen Komponente allein zur Zeit t = 0;

pH-Wert	Fall A) $(\Delta E_o/E_o)100\%$	Fall B) $(\Delta E_o \text{langs.}/E_o)100\%$
6	87	83
6,5	79	75
7	64	61
7,5	64	61
8	89	85
Mittelwert	77	73

Tabelle 67)
Extinktionsdifferenz bei 698nm in % von $E_{P_{fr}/698}$ bezogen auf Endpunkt $E_{P_r/698}$ in Pufferlösung/4°C.

Fall A) Im photochemischen Gleichgewicht, errechnet aus (langsame + schnelle Komponente) zur Zeit t = 0;
Fall B) Wie unter A), aber nur mit dem Anteil der langsamen Komponente Allein zur Zeit t = 0;

pH-Wert	Fall A) $(\Delta E_o/E_o)100\%$	Fall B) $(\Delta E_o \text{langs.}/E_o)100\%$
6	56	53
6,5	86	82
7	56	53
7,5	44	42
8	67	64
Mittelwert	62	59

Tabelle 68)

Extinktionsdifferenz bei 665nm in % von $E_{P_{fr}/665}$ bezogen auf Endpunkt $E_{P_r/665}$ in Pufferlösung bzw. Puffer + Glycerin (1 : 1) bei 25°C.

Fall A) Im photostationären Gleichgewicht, errechnet aus (langsame + schnelle Komponente) zur Zeit t = 0;
Fall B) Wie unter A), aber nur mit dem Anteil der langsamen Komponente allein zur Zeit t = 0;

pH-Wert	Fall A) $(\Delta E_o/E_o)100\%$	Fall B) $(\Delta E_o\text{langs.}/E_o)100\%$	Lösung
6	136	122	Puffer
7	125	113	
8	120	108	
Mittelwert	127	114	
6	112	106	1:1
7	114	108	
8	86	82	
Mittelwert	104	99	

Tabelle 69)

Extinktionsdifferenz bei 730nm in % von $E_{P_{fr}/730}$ bezogen auf Endpunkt $E_{P_r/730}$ in Pufferlösung bzw. Puffer + Glycerin (1 : 1) bei 25°C.

Fall A) Im photostationären Gleichgewicht, errechnet aus (langsame + schnelle Komponente) zur Zeit t = 0;
Fall B) Wie unter A), aber nur mit dem Anteil der langsamen Komponente allein zur Zeit t = 0;

pH-Wert	Fall A) ($\Delta E_o/E_o$)100%	Fall B) (ΔE_olangs./E_o)100%	Lösung
6	98	92	Puffer
7	99	93	
8	96	90	
Mittelwert	98	92	
6	95	90	1:1
7	98	93	
8	96	91	
Mittelwert	96	91	

Tabelle 70)

Absorptionsänderung während der Dunkelrelaxation nach saturierend HR-Licht in Pufferlösung bei 4°C, normiert auf $E_{P_R max} = 1,0$; für die schnelle Komponente wurden die Mittelwerte zugrunde gelegt.

1) Bezogen auf $(\Delta E_o/E_o)100\% = 108\%$ (Mittelwert);

2) Bezogen auf $(\Delta E_o/E_o)100\% = 94\%$ (Mittelwert);

t (min.)	pH-Wert	$+\Delta E_{665}$ [1]	$-\Delta E_{730}$ [2]	$\lvert\Delta E_{665}\rvert+\lvert\Delta E_{730}\rvert$	$\lvert\Delta E_{665}/\Delta E_{730}\rvert$
	6	0,058	0,034	0,092	1,7
	6,5	0,058	0,031	0,089	1,9
5	7	0,059	0,029	0,088	2,0
	7,5	0,061	0,027	0,088	2,3
	8	0,063	0,024	0,087	2,6
Mittelwert		0,059	0,029	0,088	2,0
	6	0,068	0,045	0,113	1,5
	6,5	0,069	0,039	0,108	1,8
10	7	0,071	0,035	0,106	2,0
	7,5	0,074	0,034	0,108	2,2
	8	0,080	0,026	0,106	3,1
Mittelwert		0,072	0,036	0,108	2,0
	6	0,078	0,056	0,134	1,4
	6,5	0,079	0,046	0,125	1,7
15	7	0,082	0,041	0,123	2,0
	7,5	0,087	0,039	0,126	2,2
	8	0,096	0,027	0,125	3,6
Mittelwert		0,084	0,042	0,126	2,0

VII) LITERATURVERZEICHNIS

Anderson, G.R., E.L.Jenner und F.E.Mumford, Biochemistry 8, 1182 (1969)
Anderson, G.R., E.L.Jenner und F.E.Mumford, Biochim. Biophys.Acta 221, 69 (1970)
Apel, K., in: Photoreceptors and Plant Development, S.203ff, Antwerpen University Press, Antwerpen 1980
Balangé, A.P., Physiol.Vég.12, 95 (1974)
Balangé, A.P. und P.Rollin, Plant Sci. Letters 1, 59 (1973)
Boisard, J., Physiol.Vég. 7, 119 (1969)
Boisard, J., C.J.P.Spruit und P.Rollin, Meded. Landbouwhogeschool Wageningen 68, 17 (1968)
Bois-Choussy, M. und M.Barbier, Heterocycles 9, 677 (1978)
Borthwick, H.A., S.B.Hendricks, M.J.Schneider, R.B.Taylorsen und V.K.Toole, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 64, 479 (1969)
Borthwick, H.A., S.B.Hendricks, M.W.Parker, E.H.Toole und M.K.Toole, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 38, 662 (1952a)
Borthwick, H.A., S.B.Hendricks und M.W.Parker, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 38, 929 (1952b)
Boussiba, S. und A.E.Richmond, Arch.Microbiol. 120, 155 (1979)
Briggs, W.R. und D.C.Fork, Plant Physiol. 44, 1081 (1969)
Briggs, W.R., G.Gardner und D.W.Hopkins, in: Phytochrome, S.145ff, Academic Press, London-New York 1972
Briggs, W.R. und H.V.Rice, Ann. Rev. Plant Physiol. 23, 293 (1972)
Brockmann jr., H. und G.Knobloch, Chem. Ber. 106, 803 (1973)
Burke, M.J., D.C.Pratt und A.Moscowitz, Biochemistry 11, 4025 (1972)
Butler, W.L., Sci. Am. 203, 560 (1960)
Butler, W.L., S.B.Hendricks und H.W.Siegelman, Photochem. Photobiol. 3, 521 (1964)
Butler, W.L. und H.C.Lane, Plant Physiol. 40, 13 (1965)
Butler, W.L., H.C.Lane und H.W.Siegelman, Plant Physiol. 38, 514 (1963)
Butler, W.L., K.H.Norris, H.W.Siegelman und S.B.Hendricks, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 45, 1703 (1959)

Butler, W.L., H.W.Siegelman und C.O.Miller, Biochemistry 3, 851 (1964)
Cavaleiro, J.A.S. und K.M.Smith, J.C.S. Perkin I 1973, 2149 (1973)
Chae, Qu. und P.-S.Song, J. Amer. Chem. Soc. 97, 4176 (1975)
Correll, D.L., J.L.Edwards, W.H.Klein und W.Shropshire jr., Biochim.Biophys.Acta 168, 36 (1968a)
Correll, D.L., J.L.Edwards und W.Shropshire jr., Photochem. Photobiol. 8, 465 (1968b)
Correll, D.L., E.Steers jr., K.M.Towe und W.Shropshire jr., Biochim.Biophys.Acta 168, 46 (1968c)
Crespi, H.L., L.J.Boucher, G.D.Norman, J.J.Katz und R.C.Dougherty, J. Amer. Chem. Soc. 89, 3642 (1967)
Cross, D.R., H.Linschitz, V.Kasche und J.Tennenbaum, Proc. Nat. Sci. USA 61, 1095 (1968)
Falk, H., S.Gergely, K.Grubmayr und O.Hofer, Z.Naturforsch. 32b, 299 (1977)
Falk, H., K.Grubmayr, E.Haslinger, T.Schlederer und K.Thirring, Mh. Chem. 109, 1451 (1978)
Falk, H. und G.Höllbacher, Mh. Chem. 109, 1451 (1978)
Falk, H., N.Müller und T.Schlederer, Mh. Chem. 111, 159 (1980)
Fry, K.T. und F.E.Mumford, Biochem. Biophys. res. Comm. 45, 1466 (1971)
Fuhrhop, J.-H., A.Salek, J.Subramanian, G.Mengersen und S.Besecke, Liebigs Ann. Chem. 1975, 1131 (1975)
Furuya, M., in: Progress in Phytochemistry, Bd.1, S.347ff, Interscience Publ., London - New York - Sidney 1968
Furuya, M., W.G.Hopkins und W.S.Hillman, Arch. Biochem. Biophys. 112, 150 (1965)
Gardner, G. und W.R.Briggs, Photochem.Photobiol. 19, 367 (1974)
Gardner, G., C.S.Pike, H.V.Rice und W.R.Briggs, Plant Physiol. 48, 686 (1971)
Glazer, A.N. und S.Fang, J. Biol. Chem. 248, 659 (1973)
Glazer, A.N., S.Fang und D.M.Brown, J. Biol. Chem. 248, 5679 (1973)
Gossauer, A. und R.-P.Hinze, J. Org. Chem. 43, 283 (1978)
Gossauer, A., R.-P.Hinze und K.Kutschan, Chem. Ber. 114, 132 (1981)

Gossauer, A. und J.-P.Weller, J. Amer. Chem. Soc. 100, 5928 (1978)
Gressel, J., Photochem.Photobiol. 30, 749 (1979)
Grombein, S., Dissertation, Universität München 1976
Grombein, S., W.Rüdiger und H.Zimmermann, Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 356, 1706 (1975)
Guthoff, C., Dissertation, Universität München 1978
Hartmann, K.M., Photochem.Photobiol. 5, 349 (1966)
Hendricks, S.B. und H.A.Borthwick, Proc.Nat.Acad.Sci. USA 58, 2125 (1967)
Hillman, W.S., Am. J. Bot. 51, 1102 (1964)
Hopkins, D.W. und W.L.Butler, Plant Physiol. 45, 567 (1970)
Hunt, R.E. und L.H.Pratt, Plant Physiol. 64, 332 (1979)
Hunt, R.E. und L.H.Pratt, Biochemistry (in press)
Jung, J., P.-S.Song, R.J.Paxton, M.S.Edelstein, R.Swanson und E.E.Hazen jr., Biochemistry 19, 24 (1980)
Kasperbauer, M.J., H.A.Borthwick und S.B.Hendricks, Bot. Gaz. (Chicago) 124, 444 (1963)
Kendrick, R.E., Nature 250, 159 (1974)
Kendrick, R.E. und B.Frankland, Planta 82, 317 (1968)
Kendrick, R.E. und C.J.P.Spruit, Nature New Biol. 237, 281 (1972)
Kendrick, R.E. und C.J.P.Spruit, Plant Physiol. 52, 327 (1973)
Kendrick, R.E. und C.J.P.Spruit, Planta (Berlin) 120, 265 (1974)
Kendrick, R.E. und C.J.P.Spruit, Photochem.Photobiol. 26, 201 (1977)
Kidd, G.H., R.E.Hunt, M.L.Boeshore und L.H.Pratt, Nature 276, 733 (1978)
Klein, G., S.Grombein und W.Rüdiger, Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 358, 1077 (1977)
Klein, G. und W.Rüdiger, Z. Naturforsch. 34c, 192 (1978)
Köst, H.-P., Dissertation, Universität München 1974
Köst, H.-P., W.Rüdiger und D.J.Chapman, Liebigs Ann. Chem. 1975, 1582 (1975)
Krauss, C., Dissertation, Universität München 1980
Krauss, C., C.Bubenzer und H.Scheer, Photochem.Photobiol. 30, 473 (1979)

Kroes, H.H., Biochem. Biophys. Res. Comm. 31, 877 (1968)
Kroes, H.H., Meded. Landbouwhogeschool Wageningen, 70, 1 (1970)
Kroes, H.H., A. van Rooijen, J.M.Geers und E.H.M.Greuell, Biochim. Biophys. Acta 175, 409 (1969)
Kufer, W., Dissertation, Universität München 1980
Kufer, W. und H.Scheer, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 360, 935 (1979)
Laemmli, U.K. und M.Favre, J. Mol. Biol. 80, 575 (1973)
Lagarias, J.C., A.N.Glazer und H.Rapoport, J. Amer. Chem. Soc. 101, 5030 (1979)
Lagarias, J.C. und H.Rapoport, J. Amer. Chem. Soc. 102, 4821 (1980)
Lane, H.C., H.W.Siegelman, W.L.Butler und E.M.Firer, Plant Physiol. 38, 414 (1963)
Langer, E., H.Lehner, W.Rüdiger und B.Zickendraht-Wendelstadt, Z. Naturforsch. 35c, 367 (1980)
Lehner, H., S.E.Braslavsky und K.A.Schaffner, Angew. Chem. 90, 1012 (1978a)
Lehner, H., S.E.Braslavsky und K.A.Schaffner, Liebigs Ann. Chem. 1978, 1990 (1978b)
Linschitz, H., V.Kasche, W.L.Butler und H.W.Siegelman, J. Biol. Chem. 241, 3395 (1966)
Linschitz, H. und V.Kasche, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 58, 1059 (1967)
Lisansky, S.G. und A.W.Galston, Plant Physiol. 53, 352 (1974)
Manabe, K. und Furuya M., Plant and Cell Physiol. 12, 95 (1971)
Mancinelli, A.L., Photochem.Photobiol. 32, 853 (1980)
Marmé, D., Ann. Rev. Plant Physiol. 28, 173 (1977)
Marmé, D., in: Plant Growth and Light Perception, S.101ff, University of Aarhus, Aarhus 1979
Maurer, H.R., in: Disc-electrophoresis and related techniques od polyacrylamide-gelelectrophoresis, Walter de Gruyter, Berlin-New York 1971
Miller, C.O., R.J.Downs und H.W.Siegelman, Bioscience 15, 596 (1965)
Mohr, H., Photochem.Photobiol. 5, 469 (1966)

Mohr, H., Photochem.Photobiol. 20, 539 (1974)
Muckle, G., J.Otto und W.Rüdiger, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 359, 345 (1978)
Mumford, F.E., Biochemistry 5, 522 (1966)
Mumford, F.E. und E.L.Jenner, Biochemistry 5, 3657 (1966)
Mumford, F.E. und E.L.Jenner, Biochemistry 10, 98 (1971)
Negbi, M., D.W.Hopkins und W.R.Briggs, Plant Physiol. 56, 157 (1974)
Pasternak, R. und G.Wagnière, J. Amer. Chem. Soc. 101, 1662 (1979)
Pike, C.S. und W.R.Briggs, Plant Physiol. 49, 514 (1972a)
Pike, C.S. und W.R.Briggs, Plant Physiol. 49, 521 (1972b)
Pratt, L.H., Photochem.Photobiol. 21, 99 (1975a)
Pratt, L.H., Photochem.Photobiol. 22, 33 (1975b)
Pratt, L.H., Photochem.Photobiol. 27, 81 (1978)
Pratt, L.H. und W.L.Butler, Photochem.Photobiol. 11, 361 (1970)
Pratt, L.H. und R.A.Coleman, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 68, 2431 (1971)
Pratt, L.H. und S.C.Cundiff, Photochem.Photobiol. 21, 91 (1975)
Rice, H.V. und W.R.Briggs, Plant Physiol. 51, 927 (1973)
Rice, H.V., W.R.Briggs und C.J.Jackson-Wkite, Plant Physiol. 51, 917 (1973)
Rigbi, M., J.Rosinski, H.W.Siegelman und J.C.Sutherland, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 77, 1961 (1980)
Roswell, E., in: Methods in Enzymology, Bd.5, s.685ff, Academic Press, New York 1962
Roux, S.J., S.G.Lisansky und B.M.Stoker, Physiol. Plant. 35, 85 (1975)
Rubinstein, B., K.S.Drury und R.B.Park, Plant Physiol. 44, 105 (1969)
Rüdiger, W., Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 350, 1291 (1969)
Rüdiger, W., Fortschr. Chem. Org. Naturst. 29, 59 (1971)
Rüdiger, W., in: Phytochrome, S.107ff, Academic Press, London-New York 1972a
Rüdiger, W., in: Phytochrome, S.129ff, Academic Press, London-New York 1972b

Rüdiger, W. und D.L.Correll, Liebigs Ann. Chem. 723, 208 (1969)
Schäfer, E., in: Light and Plant Development, S.5ff, London 1976
Scheer, H., Z. Naturforsch. 31c, 413 (1976)
Scheer, H., H.Formanek und W.Rüdiger, Z. Naturforsch. 34c, 1085 (1979)
Scheer, H. und C.Krauss, Photochem.Photobiol. 25, 311 (1977)
Scheer, H. und W.Kufer, Z. Naturforsch. 32c, 513 (1977)
Scheer, H. und H.Lehner (in prep.)
Scheer, H., U.Linsenmeier und C.Krauss, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 358, 185 (1977)
Schröder, J., F.Kreuzaler, E.Schäfer und K.Hahlbrock, J. Biol. Chem. 254, 57 (1979)
Siegelman, H.W. und W.L.Butler, Ann. Rev. Plant Physiol. 16, 383 (1965)
Siegelman, H.W. und E.M.Firer, Biochemistry 3, 418 (1964)
Siegelman, H.W., B.C.Turner und S.B.Hendricks, Plant Physiol. 41, 1289 (1966)
Smith, H.: Phytochrome and Photomorphogenesis. Mc Graw Hill, London 1975
Smith, W.O., in: Book of Abstracts. Photoreceptors and Plant Development, S.3, Universiteit Antwerpen, Antwerpen 1979
Song, P.-S., Qu.Chae und J.D.Gardner, Biochim. Biophys. Acta 576, 479 (1979)
Spruit, C.J.P. und R.E.Kendrick, Photochem.Photobiol. 18, 145 (1973)
Spruit, C.J.P. und R.E.Kendrick, Photochem.Photobiol. 26 (2), 133 (1977)
Stoker, B.M., S.J.Roux und W.E.Brown, Nature 271, 180 (1978a)
Stoker, B.M., K.Mc Entire und S.J.Roux, Photochem.Photobiol. 27, 597 (1978b)
Sugimoto, T., K.Ishikawa und H.Suzuki, J. Phys. Soc. Japan 40, 258 (1976)
Taylor, A.O., Plant Physiol. 43, 767 (1968)
Taylor, A.O. und B.A.Bonner, Plant Physiol. 42, 762 (1967)
Teale, F.W.J. und R.E.Dale, Biochem. J. 116, 161 (1970)
Tobin, E. in: Plant Growth and Light Perception. Book of Abstracts, S.100f, University of Aarhus, Aarhus 1978

Tobin, E.M. und W.R.Briggs, Photochem.Photobiol. 18, 487 (1973)
Vernotte, C., Photochem.Photobiol. 14, 163 (1971)
Weber, H. und M.Osborne, J. Biol. Chem. 244, 4406 (1969)
Weller, J.-P. und A.Gossauer, Chem.Ber. 113, 1603 (1980)

Ἐχχείρησιν naturae nennts die Chemie
spottet ihrer selbst, und weiß nicht wie.

Man klagt über wissenschaftliche Akademien,
daß sie nicht frisch genug ins Leben eingreifen;
das liegt aber nicht an ihnen, sondern an der Art,
die Wissenschaften zu behandeln, überhaupt.

Da es aber einmal geschehen war und die Wissenschaften sich als ein Staatsglied im Staatskörper fühlten, einen Rang bei Prozessionen und anderen Feierlichkeiten erhielten, war bald der höhere Zweck aus den Augen verloren; man stellte seine Person vor, und die Wissenschaften hatten auch Mäntelchen um und Käppchen auf.

Goethe

Lebenslauf

9.5.1950	Geburt in München
September 1956	Einschulung in die Volksschule an der Schulstraße, München
September 1960	Übertritt in das staatliche Ludwigs-Gymnasium, München (humanistisches Gymnasium)
Juni 1969	Abitur am gleichnamigen Gymnasium

Seit dem Abitur tätig als freiberuflicher Journalist (Feuilleton); nebenher Studium der Physik, Chemie, Biologie, Slavistik, Amerikanistik, Theaterwissenschaften an der Ludwigs-Maximilian Universität München.

Oktober 1976	Diplom-Hauptprüfung in Chemie an der Universität München (mit Wahlpflichtfach Biochemie)
November 1976 - September 1977	Diplomarbeit bei Prof.Dr.G.Hartmann, ausgeführt am Lehrstuhl für Phytochemie
Oktober 1977	Beginn der Dissertation am Lehrstuhl für Phytochemie bei Prof.Dr.W.Rüdiger